

# 加兰他敏对间歇性低氧引起的认知损害的预防作用

李祥云 唐 婷<sup>2</sup> 热不开提·地里夏提 邓水香 黄延焱<sup>△</sup>

(复旦大学附属华山医院老年科 上海 200040)

**摘要** 目的 探究加兰他敏对间歇性低氧引起的认知损伤是否有保护作用,从而说明其对睡眠呼吸暂停综合征引起的认知损害是否有预防作用。方法 建立间歇低氧大鼠模型,行水迷宫试验检测行为功能变化,免疫组化检测海马神经元及胶质细胞数目的变化。结果 加兰他敏与间歇低氧模型组相比,行水迷宫的平均逃避潜伏期缩短,游泳总距离减少,免疫组化的结果海马神经元的数目有所增加,胶质细胞的数目减少。结论 加兰他敏对间歇性低氧引起的认知损伤有明显的改善作用,可能与减少神经元的丢失及减少胶质细胞的再生有关。所以对于诊断了睡眠呼吸暂停综合征(ASA)的患者,如果同时合并其他痴呆的易感因素,可预防性应用加兰他敏。

**关键词** 加兰他敏 睡眠呼吸暂停综合征 间歇性低氧

**中图分类号** Q95-3 R56 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2011)13-2413-03

## Effects of Galantamine in Prevention of Cognitive Impairment Induced by Intermittent Hypoxia

LI Xiang-yun<sup>1</sup>, TANG Ting<sup>2</sup>, REBUKAITI·DiLixiati, DENG Shui-xiang, HUANG Yan-yan<sup>1△</sup>

(Department of Geriatrics, Huashan Hospital, Fudan University, 200040, Shanghai, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate if galantamine has a protective effect on cognitive impairment caused by intermittent hypoxia, which indicates if it has a preventive effect on cognitive impairment caused by sleep apnea syndrome. **Methods** A rat model of intermittent hypoxia was established; the water-maze test was for detection of changes in behavior; hippocampal neurons and glial cell number changes was detected by immunohistochemistry. **Results** : Galantamine compared with the intermittent hypoxia model, in water-maze test, the average escape latency and the total swimming distance decreased; the results of immunohistochemistry, the number of neurons increased, reducing the number of glial cells. **Conclusion** Galantamine has a significant improvement for cognitive function damage induced by intermittent hypoxia, which may concern with reducing the loss of neurons and reducing the regeneration of glial cells. So for the diagnosis of sleep apnea syndrome (ASA) of the patients, if at the same time combined with other dementia risk factors, may prophylactic use of galantamine.

**Key words:** Galantamine; Sleep apnea syndrome; Intermittent hypoxia

**Chinese Library Classification(CLC):** Q95-3, R56 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2011)13-2413-03

### 前言

睡眠呼吸暂停综合征(sleep apnea syndrome SAS)是临床常见病,SAS患者的认识损伤与间歇性低氧有关<sup>[1-2]</sup>。加兰他敏是临床上的治疗痴呆的药物<sup>[3-6]</sup>,而对SAS患者的应用目前无研究。本实验旨在探究加兰他敏对间歇性低氧引起的认知损伤是否有保护作用,从而说明其对睡眠呼吸暂停综合征引起的认知损害是否有预防作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物

健康成年雄性SD大鼠60只(由复旦大学上海医学院实验动物中心提供)。

#### 1.2 主要试剂

0.1MPa的99%纯氮、0.05MPa的空气(由中科院有机所提供);加兰他敏(西安杨森制药有限公司)溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)、兔抗大鼠神经元核抗原(NeuN)、兔抗大鼠胶质纤维酸性蛋白(GFAP)(由博士德生物工程有限公司提供)。

#### 1.3 主要仪器

SCY-1测氧仪(由深圳市三诺仪表有限公司提供);MT-200 Morris水迷宫视频跟踪分析系统(由成都泰盟科技有限公司提供)。

#### 1.4 实验方法

1.4.1 动物分组及建模 健康成年雄性SD大鼠n只,采取随机分配原则,分为间歇缺氧模型组,加兰他敏组,常氧对照组。间歇低氧模型组:大鼠在缺氧仓内每天放置8小时(9am-5pm)持续8周,缺氧仓内氧浓度为10-11%,由测氧仪监测。缺氧仓侧壁中央取直径为5mm的孔两个,分别用于输入纯氮与空气,0.1MPa的99%纯氮15秒和0.05MPa的空气15秒交替注入缺氧仓中。加兰他敏组建模与间歇低氧模型组相同,予加兰他敏进行干预,灌胃剂量2mg/kg/day持续8周。常

作者简介 李祥云(1986-)女,硕士研究生,主要研究方向 睡眠呼吸暂停综合征对中枢神经系统的影响

△通讯作者 黄延焱 副主任医师,Tel:13661633953,

E-mail sugar\_94@yahoo.cn

(收稿日期 2011-03-05 接受日期 2011-03-30)

氧对照组 大鼠在仓内每天放置 8 小时 ,持续 8 周 ,仓内空气与外界相通<sup>[7-9]</sup>。

1.4.2 水迷宫行为功能检测 所有大鼠处死前行水迷路试验。即行为功能检测。以 MT-200 Morris 水迷宫视频跟踪分析系统观察大鼠空间学习记忆的变化从而反映大鼠认知功能的改变。该系统由大小鼠通用 Morris 水迷宫、视频摄像系统、视频分析软件以及加密狗组成。水迷宫为圆桶状水池 ,130cm×50cm ,水深 30cm。人为地将水池等分为 4 部分 ,供大鼠停靠的站台固定在第 2 部分的中心并沉浸于水面下 2cm。在水池周围张贴明显的参照线索 ,以供大鼠寻找和定位平台。在迷宫上方安装视频摄像头 ,记录大鼠的整个运动轨迹 ,并由分析软件进行分析<sup>[10-14]</sup>。

整个实验共进行 6 天 ,每天分上、下午 2 次进行。将大鼠面向池壁、按顺序地从 4 个等分水池的点放入到池中 ,记录大鼠从入水到找到并爬上平台的时间。每次在平台上休息 30s 再进行下一次检测。如果大鼠在 120s 内未找到平台 ,就人为地将其引导到平台 ,此时潜伏期记录为 120s。大鼠学习记忆成绩以平均逃避潜伏期和平均游泳总距离这 2 个参数来反映。

1.4.3 海马组织切片观察 观察 8 周后 ,处死所有大鼠。各组大鼠于处死前两小时给予腹腔注射质量浓度 10mg/ml 的溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)生理盐水液 60mg/kg。水合氯醛麻醉下断头

取脑 ,将脑组织迅速至 4%多聚甲醛固定 24 小时 ,取海马齿状回(DG Dentate Gyrus)部位 ,连续冠状切片 ,每张脑片厚 3μm。

brdu 和 neun 行双标 ,检测神经元的再生 ,而 brdu 和 GFAP 行双标 ,检测胶质细胞的再生。BrdU /NeuN 和 BrdU /GFAP 采用双标记染色 ,全自动彩色图像处理系统进行图像分析 ,各组各时间点每只大鼠随机选取 5 张非连续的脑片 ,在×400 镜下 ,每张切片选取 10 个视野 ,计数 BrdU/NeuN 或 BrdU/GFAP 双标细胞 ,求其平均值。

1.4.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件系统进行处理 ,所有数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示 ,各组间比较采用 t 检验 , $P < 0.05$  有统计学意义。

2 实验结果

2.1 行为功能检测结果

与常氧对照组比较 ,间歇低氧模型组大鼠在 Morris 水迷宫中的空间学习记忆能力明显下降 ,表现为平均逃避潜伏期延长和平均游泳总距离增加 ;与间歇低氧模型组比较 ,加兰他敏组平均逃避潜伏期缩短和平均游泳总距离减少 ,说明加兰他敏对间歇缺氧引起的认知损害有所改善。结果见表 1。

表 1 水迷宫实验大鼠平均逃避潜伏期和平均游泳总距离的比较

Table 1 The comparison of escape latency and the average total distance swimming of of rats in morris water maze test

| Group                            | Number of cases | The average incubation period(s) | Total distance swimming(mm) |
|----------------------------------|-----------------|----------------------------------|-----------------------------|
| Normoxic control group           | 20              | 24.56±5.68                       | 5986.4±1598.2               |
| Intermittent hypoxia model group | 20              | 81.43±18.75*                     | 21260.7±5864.1*             |
| Galantamine group                | 20              | 45.22±9.65*                      | 1204.2±3033.8*              |

Vs Control group ,\* $P < 0.05$  ,vs Model group ,\* $P < 0.05$

2.2 海马组织切片结果

与常氧对照组比较 ,间歇低氧模型组海马齿状回 BrdU /NeuN 阳性细胞数目减少 ,BrdU/GFAP 阳性细胞数目增加 ,表明间歇低氧导致神经元减少和胶质细胞增加 ;与间歇低氧模型

组比较 ,加兰他敏组 BrdU/NeuN 阳性细胞数目有所增加 ,BrdU/GFAP 阳性细胞数目明显减少。说明加兰他敏减少了间歇低氧导致的神经元的丢失 ,并减少胶质细胞的再生。结果见表 2。

表 2 海马齿状回 BrdU/NeuN 和 BrdU/GFAP 阳性细胞数目的比较

Table2 Dentate gyrus BrdU / NeuN and BrdU / GFAP positive cells in comparison

| Group                            | BrdU/NeuN( Number of/mm <sup>2</sup> ) | BrdU/GFAP( Number of/mm <sup>2</sup> ) |
|----------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| Control group                    | 28.66±0.74                             | 20.59±1.47                             |
| Intermittent hypoxia model group | 21.52±1.38*                            | 36.05±2.13*                            |
| Galantamine group                | 26.34±1.79                             | 27.83±2.01*                            |

Vs Control group ,\* $P < 0.05$  ,vs Model group ,\* $P < 0.05$

3 讨论

睡眠呼吸暂停综合征(SAS)是临床常见临床上常见并具有严重潜在危险性的疾病 ,主要表现为睡眠时反复呼吸暂停和呼吸表浅 ,伴低氧血症、高碳酸血症和睡眠结构紊乱 ,引发白天嗜睡和多系统器官的各种并发症<sup>[15]</sup>。

认知功能是人类高级神经活动的重要组成部分 ,包括定

向、注意、集中、警觉、记忆、学习、计算、语言、理解、判断、逻辑推理、行为以及执行等多个方面。很多中枢神经系统疾病和全身性疾病均可造成认知功能损害 ,如阿尔茨海默病、脑血管病、精神分裂症以及营养代谢性疾病等<sup>[16]</sup>。

SAS 患者的认识损伤与间歇性低氧有关<sup>[1-2]</sup>。因此我们建立模拟间歇低氧模型来探索间歇低氧对大鼠的认知功能的影响以及海马齿状回神经元和胶质细胞的数目变化 ,进而评价临床

上的治疗痴呆的药物加兰他敏对间歇低氧引起的认知损害的预防作用。

Morris 水迷宫是英国心理学家 Morris 于 20 世纪 80 年代初设计并应用于脑学习记忆机制研究的一种实验手段,其在 AD 研究中的应用非常普遍<sup>[17]</sup>。我们的研究显示,间歇低氧大鼠在水迷宫中的空间学习能力受到严重损害,表现为大鼠在 Morris 水迷宫中寻找平台的平均逃避潜伏期延长和平均游泳总距离增加,加兰他敏组平均逃避潜伏期缩短和平均游泳总距离减少,说明加兰他敏对间歇低氧引起的认知损害有所改善。

BrdU 是一种胸腺嘧啶脱氧核苷类似物,BrdU 阳性细胞可被看作具有增殖活性的细胞。NeuN 是神经元的标记蛋白,GFAP 是星型胶质细胞活化及增殖的标志物,BrdU/NeuN 双标阳性细胞代表增殖的神经干细胞向神经元分化,BrdU/GFAP 双标的阳性细胞代表增殖的神经干细胞分化方向为神经胶质细胞<sup>[18-20]</sup>。我们的研究显示,间歇低氧模型组海马齿状回 BrdU/NeuN 阳性细胞数目减少,BrdU/GFAP 阳性细胞数目增加,表明间歇低氧引起神经元的丢失和胶质细胞再生增加,加兰他敏减少了间歇低氧引起的神经元的丢失,并减少胶质细胞的再生。

总之,加兰他敏对间歇低氧引起的认知损害有明显的改善作用,可能与减少神经元的丢失以及减少胶质细胞的再生有关。所以对于诊断了睡眠呼吸暂停综合征(ASA)的患者,如果同时合并其他痴呆的易感因素,可预防性应用加兰他敏。而加兰他敏对间歇缺氧引起的认知损害的改善的分子机制,有待进一步更深入的研究。

#### 参考文献(References)

- [1] Xu Chun-hua, Lin Yong. Changes of blood lipid levels in patients with obstructive sleep apnea hypopnea syndrome [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2007, 7(4): 591-592
- [2] Guo Yun-yun, Xu Jiang-tao, Song Yong-bin, et al. Effect of chronic episodic hypoxia on behavior and striatal dopamine content in mice of Parkinson disease model [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(12):2217-2220
- [3] Mulder J..Galantamine-induced behavioral recovery after sublethal excitotoxic lesions to the rat medial septum [J]. Behavioural Brain Res,2005,(163):33-41
- [4] Geerts H.. Indicators of neuroprotection with galantamine [J]. Brain. Res. Bulletin, 2005, (64):519-524
- [5] Ezoulin M. J. Antioxidative properties of galantamine on neuronal damage induced by hydrogen peroxide in SK-N-SH cells [J]. Neuro. Toxicology, 2008, (29):270-277
- [6] Bajgar J. Changes of cholinesterase activities in the plasma and some tissues following administration of l-carnitine and galanthamine to rats

- [J].Neuro.Sci. Lett, 2007, (411):212-216
- [7] Fletcher EC, Lesske J, Qian W, et al. Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats [J]. Hypertension, 1992, 19(6Pt1):555-561
- [8] McGuire M, Mac Dermott M, Bradford A. The effects of chronic episodic hypercapnic hypoxia on rat upper airway muscle contractile properties and fiber-type distribution [J]. Chest, 2002, 122 (4):1400-1406
- [9] Wang Zhang, Si Liang-yi, Liao You-bin. Establishment of Sleep Apnea Syndrome Model in Rats [J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2006, 14(1): 40-43
- [10] MorrisRGM. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat [J]. Neuro. Sci Methods, 1984, 11(1):47-60
- [11] Stewart CA, MorrisRGM. Thewatermaze [M]. Sahgal A. Behavioural Neuroscience: A Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1993: 107-122
- [12] Brandeis R, Brandys R, Yehuda S. The use of the Morris water-maze in the study of memory and learning [J]. Neuro science, 1989, 48(122): 29-69
- [13] Vasconcellos AP, Zugno A I, Dos Santos AH. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> 2ATPase activity is reduced in hippocampus of rats submitted to an experimental model of depression: effect of chronic lithium treatment and possible involvement in learning deficits [J]. Neuro biol Learn Mem, 2005, 84 (2):102-110
- [14] Choeiri C, Hewitt K, Durkin J. Longitudinal evaluation of memory performance and peripheral neuropathy in the Ins2C96Y Akita mice [J]. Behav Brain Res, 2005, 157(1):31-38
- [15] Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, et al. Pathophysiology of sleep apnea [J]. Physiol Rev, 2010, 90(1):47-112
- [16] Van Munster BC, De Rooij SE. Hospitalization and cognitive function in older adults [J]. JAMA, 2010, 303(21):2137-2138
- [17] Maragos N, Berlis A. High resolution computerized tomography of the petrous bones in a bone algorithm and 2D reconstruction for evaluation of the facial nerve canal[J]. HNO, 1995, 43(12):732-736
- [18] Sehara Y, Hayashi T, Deguchi K, et al. Distribution of inducible nitric oxide synthase and cell proliferation in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion [J]. Brain Res, 2006; 1093(1):19-27
- [19] Hundahl C, Kelsen J, Kjær K, et al. Does neuroglobin protect neurons from ischemic insult? A quantitative investigation of neuroglobin expression following transient MCAO in spontaneously hypertensive rats [J]. Brain Res, 2006, 1085(1):19-27
- [20] Réhl C, Lucius R, Sievers J. The effect of activated microglia on astrogliosis parameters in astrocyte cultures [J]. Brain Res, 2007, 1129(1):43-52