

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.05.010

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2016.05.010>

依达拉奉对血管性痴呆大鼠海马突触可塑性的影响

刘丹丹¹, 李战永²

(1. 廊坊市人民医院老年病科, 河北 廊坊 065000; 2. 廊坊师范学院生命科学学院, 河北 廊坊 065000)

[摘要] 目的: 探讨依达拉奉(edaravone, Eda)对血管性痴呆(vascular dementia, VD)大鼠海马CA1区神经元突触可塑性的调节作用及分子机制。方法: 成年雄性SD大鼠30只, 随机分成3组: 假手术组、VD组、VD+Eda组, 每组10只。应用Morris水迷宫(Morris water maze, MWM)测试各组大鼠的空间认知功能。MWM后, 分别记录每只大鼠海马CA1区神经元长时程增强(long-term potentiation, LTP)并进行分析比较; 电生理记录后, 大鼠断头取脑, 制备脑冰冻切片, 免疫组织化学测定海马CA1区神经生长相关蛋白-43(GAP-43)的表达情况。结果: VD组大鼠有明显的空间认知障碍; Eda治疗后, VD+Eda组大鼠的空间认知障碍得到显著改善。VD+Eda组兴奋性突触后电位(excitatory postsynaptic potential, EPSP)斜率增加百分比显著高于VD组($P<0.05$)。VD组GAP-43的表达量显著低于假手术组($P<0.01$), VD+Eda组GAP-43的表达量显著高于VD组($P<0.05$)。结论: 依达拉奉可通过提高VD大鼠海马CA1区的突触可塑性改善空间认知障碍, 其机制与依达拉奉上调VD大鼠海马CA1区GAP-43的表达有关。

[关键词] 血管性痴呆; 依达拉奉; 突触可塑性; GAP-43

Effects of edaravone on synaptic plasticity in hippocampus neurons of vascular dementia rat

LIU Dandan¹, LI Zhanyong²

(1. Department of Geriatrics, the People's Hospital of Langfang City, Langfang Hebei 065000;

2. College of Life Science, Langfang Teachers University, Langfang Hebei 065000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of edaravone (Eda) on synaptic plasticity in hippocampus neurons of vascular dementia (VD) rat, and explore the molecular mechanisms. **Methods:** Thirty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups, which were sham group ($n=10$), VD group ($n=10$) and VD + Eda group ($n=10$). The spatial cognition was measured by Morris water maze (MWM) test. The long-term potentiation (LTP) in hippocampal CA1 area was recorded and further compared after MWM. After the electrophysiological experiment, all rats were killed and their brains were isolated respectively. The expression of growth associated protein (GAP-43) in CA1 area of each rat was analyzed by immunohistochemical staining. **Results:** VD rats showed significant

收稿日期 (Date of reception): 2016-03-10

通信作者 (Corresponding author): 李战永, Email: lee1537@126.com

基金项目 (Foundation item): 廊坊师范学院科学研究项目 (LSLB201406)。This work was supported by Science Project of Langfang Teachers University (LSLB201406), P. R. China.

spatial cognitive impairment and the cognitive disorders has been significantly improved by edaravone treatment in VD+Eda group. The average percentage of EPSP slope increasing in VD+Eda group was increased markedly compared with that in VD group ($P<0.05$). For the expression of GAP-43 in the CA1 region of hippocampus in VD group, it was lower than that in sham group ($P<0.01$) as well as in VD+Eda group ($P<0.05$). **Conclusion:** Edaravone could improve the LTP in CA1 hippocampal area of VD rats. The underlying mechanism was associated with its promotion effect on the expression of GAP-43 in the CA1 region.

Keywords vascular dementia; edaravone; synaptic plasticity; GAP-43

依达拉奉(edaravone, Eda)具有清除自由基、对抗氧化应激等作用, 临床常用于治疗急性缺血性卒中。近年来的研究^[1-2]表明, Eda对缺血脑组织或神经元具有神经保护作用。有文献^[3]报道, Eda可改善血管性痴呆(vascular dementia, VD)大鼠的认知障碍, 其机制与Eda抑制脑内血管内皮细胞和神经细胞的过氧化作用, 减少大鼠脑组织中神经细胞凋亡、降低脑组织中Tau蛋白和GFAP表达水平有关。目前有关Eda对VD大鼠海马神经电生理功能调节的报道很少。本文通过建立VD大鼠动物模型, 观察Eda对VD大鼠海马CA1区神经元突触可塑性的影响, 并进一步探讨其分子机制。

1 资料与方法

1.1 实验动物及药品

清洁级SD大鼠30只, 成年、雄性, 体重230~250 g, 随机分成3组: 假手术组、VD组、VD+Eda组, 每组10只。依达拉奉注射液(5 mL: 10 mg)由南京先声东元制药有限公司生产, 神经生长相关蛋白-43(GAP-43)兔多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司, DAB试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 VD动物模型制备及动物处理

采用双侧颈总动脉永久结扎(two-vessel occlusion, 2VO)的方法制备VD大鼠动物模型^[4]。VD组大鼠在术后2周, 腹腔注射生理盐水, 剂量1.5 mL/kg, 每日2次, 连用2周; VD+Eda组大鼠在术后2周, 腹腔注射依达拉奉注射液, 剂量3 mg/kg (1.5 mL/kg), 每日2次, 连用2周; 假手术组暴露双侧颈总动脉后穿线不结扎, 关闭切口重新缝合颈部皮肤, 饲养期间不予任何处理。各组均于术后4周后行Morris水迷宫(Morris water maze, MWM)实验, 检测大鼠的空间认知功能。

1.2.2 水迷宫实验

水迷宫实验包括2个阶段, 第1阶段为定位航行实验, 每天上午、下午各1次, 连续重复5 d, 观察指标为逃避潜伏期; 第2阶段为空间探索实验, 于第6天上午进行, 观察指标为目标象限百分比。每组大鼠的测试指标(逃避潜伏期、目标象限百分比)每天得到一个平均数值, 作为最终数据进行比较分析^[5]。

1.2.3 电生理实验

30%乌拉坦(4 mL/kg)腹腔注射麻醉成功后, 大鼠俯卧位固定于大鼠脑立体定位仪上。暴露大鼠颅骨, 刺激电极顶端位于CA3区的Schaffer侧枝, 记录电极顶端位于CA1区。确定刺激强度后, 首先记录20 min的对照曲线, 然后记录60 min的CA1区兴奋性突触后电位(excitatory postsynaptic potential, EPSP)曲线^[6]。

1.2.4 免疫组织化学测定

电生理实验完成后, 各组大鼠分别断头取脑, 制备10 μ m厚的冰冻切片, 免疫组织化学染色测定分析各组大鼠GAP-43的表达情况。免疫组织化学结果的判断: 定性判断, 光镜下染成棕黄色或黄色的颗粒为阳性结果; 半定量判断, 用IPP软件计算不同组大鼠海马CA1区GAP-43的阳性表达结果, 以平均积分光密度(integral optical density, IOD)作为衡量指标^[6]。

1.3 统计学处理

所有数据都以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)的形式表示。应用SPSS18.0统计软件进行分析。水迷宫实验中, 逃避潜伏期数据用重复测量的方差分析进行统计, 其它数据的统计采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 水迷宫实验

与假手术组相比, VD组大鼠的平均逃避潜伏

期与平均目标象限百分比都明显减少($P<0.01$)。与VD组大鼠相比, VD+Eda组大鼠的平均逃避潜伏期与平均目标象限百分比显著增加($P<0.05$)。假手术组与VD+Eda组比较, 平均逃避潜伏期与平均目标象限百分比差别显著($P<0.05$)。见表1。

2.2 电生理实验

各组大鼠在高频串刺激10、20、30、40、50、60 min后, EPSP增加百分比比较: 假手术组

vs. VD组, $P<0.01$; VD+Eda组vs. VD组, $P<0.05$; 假手术组vs. VD+Eda组, $P<0.05$ 。见表2。

2.3 免疫组织化学测定

三组大鼠海马CA1区均有GAP-43阳性表达。与假手术组相比, VD组和VD+Eda组海马CA1区GAP-43阳性表达均显著减少(假手术组vs. VD组, $P<0.01$; 假手术组vs. VD+Eda组, $P<0.05$), VD+Eda组与VD组比较, 海马CA1区GAP-43阳性表达显著增加($P<0.05$)。见图1。

表1 MWM实验结果

Table 1 Results of MWM test

组别	平均逃避潜伏期/s	平均目标象限百分比/%
假手术组	17.1 ± 3.3	48.7 ± 2.6
VD组	31.2 ± 1.6*	25.9 ± 1.8*
VD+Eda组	23.8 ± 2.1 ^Δ	35.6 ± 2.0 ^Δ

VD组 vs. 假手术组, * $P<0.01$; VD+Eda组vs. VD组, ^Δ $P<0.05$; VD+Eda组vs.假手术组, ^Δ $P<0.05$ 。

VD group vs. sham group, * $P<0.01$; VD+Eda group vs. VD group, ^Δ $P<0.05$; VD+Eda group vs. sham group, ^Δ $P<0.05$ 。

表2 三组EPSP增加百分比结果

Table 2 Results of the increased EPSP percentage in 3 groups

组别	EPSP增加百分比/%						均值/%
	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	
假手术组	25.6 ± 1.2	25.9 ± 1.7	25.8 ± 1.5	26.2 ± 1.9	25.6 ± 0.7	23.8 ± 1.7	25.5 ± 1.3
VD组	16.1 ± 1.2	15.9 ± 1.4	14.7 ± 1.5	13.2 ± 1.8	12.5 ± 1.8	11.9 ± 1.6	14.1 ± 1.5*
VD+Eda组	20.7 ± 1.4	20.9 ± 1.8	21.6 ± 1.2	20.3 ± 1.1	19.7 ± 0.9	17.4 ± 0.9	20.1 ± 1.2 ^Δ

VD组 vs. 假手术组, * $P<0.01$; VD+Eda组 vs. VD组, ^Δ $P<0.05$; VD+Eda组 vs. 假手术组, ^Δ $P<0.05$ 。

VD group vs. sham group, * $P<0.01$; VD+Eda group vs. VD group, ^Δ $P<0.05$; VD+Eda group vs. sham group, ^Δ $P<0.05$ 。

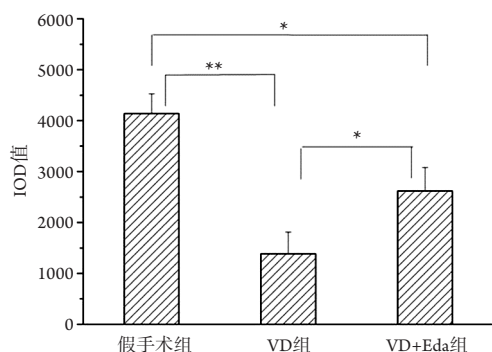


图1 三组大鼠海马CA1区GAP-43阳性表达比较

Figure 1 Comparison of GAP-43 expression in rats hippocampal CA1 region in 3 groups

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

3 讨论

VD是脑血管病变所致的痴呆, 临床表现为认知功能障碍及相关脑血管病的神经功能异常。MWM主要用于测试实验动物对空间定位的学习记忆能力, 评价与空间学习记忆相关的脑区功能, 其实验结果可作为认知障碍动物模型造模是否成功的评判依据^[4,6]。MWM实验中, 定位巡航阶段主要反映动物的空间学习能力, 空间探索阶段主要反映动物的空间记忆能力^[7]。本研究的MWM结果表明, 与假手术组大鼠比较, VD组大鼠2VO后4周有明显的空间学习和记忆障碍, 证实VD造模成功; 给予Eda治疗后, VD+Eda组大鼠的空间学习和记忆障碍得到明显改善, 提示Eda可用于治疗VD。

突触可塑性是学习记忆的细胞生理学基础。在突触可塑性的表现形式中, 有关LTP与学习记忆关系研究的较为深入, 观察LTP变化是研究学习记忆的突触机制时常用的方法。海马与短期记忆功能有关, 高频电刺激相当于学习信号的刺激, 可增强正常海马的神经突触联系, 产生LTP, 以达到传递外来信息形成短期记忆的效果^[8]。本研究结果表明, VD大鼠海马CA1区LTP减弱, 突触可塑性受损, 而Eda可改善VD时海马CA1区受抑制的LTP, 增强突触可塑性, 从而改善VD大鼠的空间认知障碍。

GAP-43在神经生长和发育时大量表达于神经元, 与轴突生长、LTP、信号转导以及递质释放等过程有关。研究^[9]表明, GAP-43可调节生长锥的肌动蛋白活性以及易化轴突生长, 对于神经递质囊泡的融合和循环、LTP的调节、空间记忆的形成和学习等方面都有重要作用^[10]。脑内GAP-43的表达上调可促进突触可塑性以提高学习记忆能力^[6]。本研究发现, Eda可促进VD大鼠海马CA1区GAP-43的表达, 提示Eda可通过上调VD大鼠海马CA1区GAP-43的表达对抗因缺血造成的突触可塑性降低。脑缺血会导致海马神经元的损伤丢失、促进海马神经元的凋亡、突触功能异常等变化^[11-13]。有研究^[14]表明, Eda可促进大鼠短暂缺血脑组织的神经修复, 促进GAP-43等神经再生因子的表达。Eda可促进小鼠齿状回损伤后的神经干细胞增殖^[15], 通过抑制ROS的生成激活MAPK信号途径, 抑制氧化应激, 显著减少炎症细胞因子的生成, 降低炎症反应和胶质细胞活性, 抑制神经细胞凋亡^[16-17]。外伤性脑损伤15 min后皮下注射Eda即可抑制齿状回神经元的过度兴奋, 减轻大鼠齿状回神经元LTP的抑制, 减轻外伤性脑损伤所致齿状回神经元的突触可塑性下降^[18]。已经证实, Eda可减轻阿尔茨海默模型小鼠的A β 沉积和氧化应激, 减轻下游Tau蛋白高度磷酸化、抑制胶质细胞活性和神经炎症反应、神经元丢失、突触功能异常^[19]。基于上述研究成果, 推测VD+Eda组大鼠海马内GAP-43表达量较VD组大鼠升高的原因可能与Eda保护脑缺血后的海马神经元、减少海马CA1区的神经细胞凋亡、促进缺血海马的神经细胞增殖有关。

本研究发现, 应用Eda治疗后, VD大鼠的空间认知能力及海马CA1区LTP与正常大鼠仍有区别, 表明Eda虽可改善VD组大鼠的空间认知障碍及突触可塑性, 但并不能完全恢复VD大鼠的神经电生理功能及空间认知障碍, 原因或与2VO术后大鼠海马CA1区部分神经元发生不可逆性坏死、

丢失有关。

总之, Eda可通过提高VD大鼠海马CA1区的突触可塑性, 改善VD大鼠的空间认知障碍, 其分子机制与Eda上调海马CA1区的GAP-43表达有关。

参考文献

1. Sun YY, Li Y, Wali B, et al. Prophylactic edaravone prevents transient hypoxic-ischemic brain injury: implications for perioperative neuroprotection[J]. *Stroke*, 2015, 46(7): 1947-1955.
2. Cao B, Chai C, Zhao S. Protective effect of Edaravone against hypoxia-induced cytotoxicity in osteoblasts MC3T3-E1 cells[J]. *IUBMB Life*, 2015, 67(12): 928-933.
3. 王健华, 赵连东, 晋光荣, 等. 依达拉奉对大鼠血管性痴呆组织中A β 、Tau和GFAP表达的影响[J]. *神经解剖学杂志*, 2011, 27(2): 203-208.
WANG Jianhua, ZHAO Liandong, JIN Guangrong, et al. Effects of Edaravone on the expressions of A β , Tau and GFAP to the brain of vascular dementia in rat[J]. *Chinese Journal of Neuroanatomy*, 2011, 27(2): 203-208.
4. Xu X, Li Z, Yang Z, et al. Decrease of synaptic plasticity associated with alteration of information flow in a rat model of vascular dementia[J]. *Neuroscience*, 2012, 206: 136-143.
5. Gomes da Silva S, de Almeida AA, Fernandes J, et al. Maternal exercise during pregnancy increases BDNF levels and cell numbers in the hippocampal formation but not in the cerebral cortex of adult rat offspring[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147200.
6. Li Z, Wang Y, Xie Y, et al. Protective effects of exogenous hydrogen sulfide on neurons of hippocampus in a rat model of brain ischemia[J]. *Neurochem Res*, 2011, 36(10): 1840-1849.
7. Snow WM, Pahlavan PS, Djordjevic J, et al. Morris water maze training in mice elevates hippocampal levels of transcription factors nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 and nuclear factor kappa B p65[J]. *Front Mol Neurosci*, 2015, 8: 70.
8. Hartley T, Lever C, Burgess N, et al. Space in the brain: how the hippocampal formation supports spatial cognition[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2013, 369(1635): 20120510.
9. Williams KR, McAninch DS, Stefanovic S, et al. hnRNP-Q1 represses nascent axon growth in cortical neurons by inhibiting Gap-43 mRNA translation[J]. *Mol Biol Cell*, 2016, 27(3): 518-534.
10. Flamm AG, Žerko S, Zawadzka-Kazimierczuk A, et al. (1)H, (15)N, (13)C resonance assignment of human GAP-43[J]. *Biomol NMR Assign*, 2016, 10(1): 171-174.
11. Zhang W, Zhang Q, Deng W, et al. Neuroprotective effect of pretreatment with ganoderma lucidum in cerebral ischemia/

- reperfusion injury in rat hippocampus[J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(15): 1446-1452.
12. Cho YS, Shin MS, Ko IG, et al. Ulinastatin inhibits cerebral ischemia-induced apoptosis in the hippocampus of gerbils[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(2): 1796-1802.
 13. Girbovan C, Plamondon H. Resveratrol downregulates type-1 glutamate transporter expression and microglia activation in the hippocampus following cerebral ischemia reperfusion in rats[J]. *Brain Res*, 2015, 1608: 203-214.
 14. Deguchi K, Miyazaki K, Tian F, et al. Modifying neurorepair and neuroregenerative factors with tPA and edaravone after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain[J]. *Brain Res*, 2012, 1436: 168-177.
 15. Kikuta M, Shiba T, Yoneyama M, et al. In vivo and in vitro treatment with edaravone promotes proliferation of neural progenitor cells generated following neuronal loss in the mouse dentate gyrus[J]. *J Pharmacol Sci*, 2013, 121(1): 74-83.
 16. Zhao ZY, Luan P, Huang SX, et al. Edaravone protects HT22 neurons from H₂O₂-induced apoptosis by inhibiting the MAPK signaling pathway[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2013, 19(3): 163-169.
 17. Wang GH, Jiang ZL, Li YC, et al. Free-radical scavenger edaravone treatment confers neuroprotection against traumatic brain injury in rats[J]. *J Neurotrauma*, 2011, 28(10): 2123-2134.
 18. Yamashita S, Hasuo H, Tokutomi T, et al. Edaravone attenuates impairment of synaptic plasticity in granule cell layer of the dentate gyrus following traumatic brain injury[J]. *Kurume Med J*, 2011, 58(2): 47-58.
 19. Jiao SS, Yao XQ, Liu YH, et al. Edaravone alleviates Alzheimer's disease-type pathologies and cognitive deficits[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(16): 5225-5230.

本文引用: 刘丹丹, 李战永. 依达拉奉对血管性痴呆大鼠海马突触可塑性的影响[J]. *临床与病理杂志*, 2016, 36(5): 581-585. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.05.010

Cite this article as: LIU Dandan, LI Zhanyong. Effects of edaravone on synaptic plasticity in hippocampus neurons of vascular dementia rat[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2016, 36(5): 581-585. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.05.010