

# 依达拉奉注射液对 AD 大鼠学习记忆和海马内 APP mRNA 表达的影响

李雷<sup>1</sup>, 于婷<sup>2</sup>, 辛勤<sup>1</sup>, 徐旭东<sup>1</sup> (1. 济宁医学院, 山东 济宁 272113; 2. 济宁市第一人民医院, 山东 济宁 272111)

**摘要:** **目的** 观察依达拉奉注射液对老年性痴呆(AD)模型大鼠学习记忆功能和海马内 APP mRNA 表达的影响。**方法** 44 只大鼠随机分为空白对照组 12 只, 造模组 12 只, 依达拉奉低剂量干预组(干预 I 组) 10 只, 依达拉奉高剂量干预组(干预 II 组) 10 只。用腹腔注射 D-半乳糖和灌胃 AlCl<sub>3</sub> 法建立 AD 模型, 从实验开始第 9 周开始, 干预 I 组和干预 II 组分别于大鼠尾静脉注射依达拉奉 3 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 和 6 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 造模组和对照组分别注射等量生理盐水。实验开始 12 周后以 Morris 水迷宫实验检测学习记忆能力, 以 RT-PCR 法检测大鼠脑内海马 APP mRNA 的表达。**结果** 依达拉奉能显著改善 AD 模型大鼠的学习记忆障碍( $P < 0.05$ ), 依达拉奉干预 I 组和干预 II 组大鼠脑内海马内 APP mRNA 表达的水平亦较造模组明显降低( $P < 0.05$ )。**结论** 依达拉奉注射液对 AD 模型大鼠的学习记忆障碍有明显的改善作用。

**关键词:** 尔茨海默病; 依达拉奉; 实验研究

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)09-0777-05

## Effects of Edaravone on Learning and Memory Ability and the Mrna Expression of $\beta$ -Amyloid Precursor Protein in the Hippocampus of Alzheimer's Disease Model Rats

LI Lei<sup>1</sup>, YU Ting<sup>2</sup>, XIN Qin<sup>1</sup>, XU Xudong<sup>1</sup> (1. Jining Medecal College, Jining 272113, China; 2. Jining First People's hospital, Jining 272111, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To observe the effects of edaravone on learning and memory ability and the mRNA expression of  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) in the hippocampus of Alzheimer's disease (AD) model rats. **METHODS** Forty-four rats were randomly divided into 4 groups: blank control group(12), AD model group(12), edaravone low-dosage group(10) and

**作者简介:** 李雷, 男, 硕士, 讲师 Tel: (0537)2203597 E-mail: iampolkers790620@sina.com

edaravone high-dosage group(10). AD model was made by injection in peritoneum of D-galactose and administration of aluminum chloride. In the ninth week, low-dosage group and high-dosage group were injected respectively in caudal vein with edaravone  $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  and  $6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ; control group and model group were injected with equal volume normal saline. After 12 weeks, Morris water maze was used to measure the learning and memory ability, and RT-PCR was used to assay the mRNA expression of APP in the hippocampus. **RESULTS** Edaravone can significantly improve the disorder of learning and memory ability of AD model rats ( $P<0.05$ ). The APP mRNA expression levels were significantly lower in low-dosage group and high-dosage group compared with model group ( $P<0.05$ ). **CONCLUSION** Edaravone can significantly improve the disorder of learning and memory ability of AD model rats.

**KEY WORDS:** Alzheimer's disease; edaravone; empirical study

随着人类期望寿命的延长, 社会老年化问题的日趋突出, 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的发病率呈上升趋势, 已成为危害老年人健康和影响生活质量的主要疾病之一。其主要病理学特征之一是脑组织中出现大量老年斑。 $\beta$ -淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid protein, A $\beta$ )是老年斑的主要成分。A $\beta$ 来自一个跨膜糖前体蛋白—— $\beta$ -淀粉样前体蛋白( $\beta$ -amyloid precursor protein, APP)。研究发现, APP的过度表达及异常途径的裂解可能是A $\beta$ 沉积形成及AD发病的始动因素, 因此抑制和减少APP的过度产生是治疗的重要环节<sup>[1]</sup>。本实验拟研究依达拉奉注射液对AD大鼠进行药物干预, 观测其对AD大鼠行为学变化和海马APPmRNA的表达的影响, 以探讨依达拉奉注射液对AD可能的防治作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 动物** 健康 Wistar 大鼠 50 只, ♂, 鼠龄 16 周, 体重 220~340 g(山东新华抗生素厂提供, 合格证号 SCXK 鲁 20050017, 使用证号: SYSK 鲁 20050047)。实验动物饲以标准颗粒饲料, 分笼喂养, 自由饮食, 自然昼夜光线照明, 实验室内通风良好, 温度保持在 18~25 °C, 相对湿度为 40%~70%。

**1.1.2 试剂**  $\text{AlCl}_3$ (天津市双船化学试剂); D-半乳糖(天津灏洋生物制品有限公司); Rnase 抑制剂 DEPC, RAN 提取试剂 Trizol, PCR 引物, 逆转录引物 Oligo (dT) 18(美国 Invitrogen 公司); MMLV 逆转录酶, TaqDNA 聚合酶(美国 Promega 公司); 琼脂糖(sigma 公司); DNA marker(100-600bp)(北京 Tiangen 公司); dNTP(济南博雅生物技术有限公司)。

**1.1.3 仪器** PCR 扩增自动循环仪(Perlin Elmer Cetus 9700, 美国), 紫外分光光度计(UV-1206, 日本), MORISS 水迷宫(中国科学院技术研究所), 视频采集系统(中国科学院技术研究所)。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物分组** 大鼠适应性饲养一周后, 经

Moriss 水迷宫测试, 超过 2 min 未找到安全平台淘汰 6 只, 剩余 44 只, 随机分为空白对照组 12 只, 造模组 12 只, 依达拉奉低剂量干预组 10 只(以下简称干预 I 组), 依达拉奉高剂量干预组 10 只(以下简称干预 II 组)。实验后造模组死亡 2 只, 干预 I 组死亡 1 只, 干预 II 组死亡 2 只。

**1.2.2 AD 动物模型的建立和给药** 造模组, 干预 I 组和干预 II 组腹腔注射 D-半乳糖  $60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (生理盐水配制)和灌胃  $\text{AlCl}_3$   $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (双蒸水配制), 连续 12 周; 空白对照组腹腔注射等量的生理盐水和灌胃等量的双蒸水。从实验开始第 9 周开始, 干预 I 组和干预 II 组分别于大鼠尾静脉注射依达拉奉  $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  和  $6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 造模组和对照组分别注射等量生理盐水。每日上午给药, 实验共 12 周。12 周后, 采用 Morris 水迷宫法测试学习记忆能力。

**1.2.3 行为学测试** 大鼠学习, 记忆测验参照 Morris 迷宫箱进行测试所有大鼠在脑内注射后进行 Morris 水迷宫测试。水迷宫为一不锈钢的圆形水池, 直径 200 cm, 高 50 cm, 水深 30 cm, 水温控制在(25±1) °C。池壁标明 4 个入水点, 由此将水池等分为 4 个象限, 任选其中 1 个象限, 正中放置 1 个直径 11 cm、高 29 cm 的平台。迷宫上方安有摄像机, 并和录像机以及显示器连接, 自动录入大鼠游泳轨迹进行分析。测试程序包括: ①空间探索试验: 历时 5 d, 每天上下午各 4 次, 将大鼠面向池壁分别从 4 个入水点放入水中, 记录其在 2 min 内寻找到平台的时间(逃避潜伏期, escape latency)。如果大鼠在 2 min 未找到平台, 则由实验者用手牵引其至平台上, 让大鼠停留 10 s, 再放回笼中。②定位航行试验: 第 6 天撤除平台, 将大鼠任选 1 个入水点放入水中, 记录其 2 min 的游泳轨迹, 分别计算其跨越各象限内的游泳距离以及在原平台象限游泳的时间和距离占整个游泳时间和距离的百分比。

**1.2.4 标本的采集和处理** 所有大鼠饲养 3 个月, 经行为学测试后处死, 大鼠经 3% 戊巴比妥 (50 mg·kg<sup>-1</sup>) 麻醉后, 剪开胸骨暴露心脏, 经左心室插管进入升主动脉, 同时剪开右心房放血; 先快速以生理盐水 100 mL 左右进行预冲洗, 随即灌注 4 °C 预冷的含 4% 多聚甲醛和 2.5% 戊二醛的 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液 (pH7.4), 灌注约 30 min。然后断头取脑, 以无菌手术刀片切取海马和额叶脑组织迅速置于液氮中冻存, 用于 APP mRNA 的测定。

**1.2.5 RT-PCR 引物合成** MPI-S: 5' GGATGCGG AGTTCGGACGTG 3', MPI-A: 5' GTT CTGCATC TGCTCAAAG 3', 扩增产物 297bp<sup>[2]</sup>,  $\beta$ -actin-S: 5' CGTTGACATCCGTAAAGACC 3',  $\beta$ -actin-A: 5' TAGAGCCACCAATCCACACA 3', 扩增产物 176 bp。提取组织总 RNA 将大鼠断头取脑, 分离海马, 取小块海马组织, 用 Trizol 试剂按照说明书抽提组织总 RNA。应用 Oligo (dT)18 为引物, MML-V (美国 Promega 公司) 为逆转录酶将 RNA 逆转录为 cDNA, 逆转录条件为 37 °C 1 h, 95 °C 5 min, 4 °C 5 min。MPI 及内参照  $\beta$ -actin PCR 的反应体系为: 总体积 50  $\mu$ L, 10 $\times$  缓冲液 5  $\mu$ L, Mg<sup>2+</sup> 4  $\mu$ L, dNTP 0.5  $\mu$ L, 引物 (S + A) 2  $\mu$ L, 模板 cDNA 2  $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶 (美国 Promega 公司) 1  $\mu$ L, 加水至 50  $\mu$ L。扩增条件为: 95 °C 5 min 预变性, 4 °C 45 s, 56 °C 45 s, 72 °C 45 s, 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, FluorChem 9900 凝胶成像系统自动成像并光密

表 1 大鼠 5 d 逃避潜伏期的变化 (s,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 The changes of escape latency of the rats for 5 days (s,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数/只	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
对照组	12	86.3 $\pm$ 26.3	48.6 $\pm$ 17.4	21.1 $\pm$ 14.6	12.7 $\pm$ 4.6	8.5 $\pm$ 3.4
造模组	10	91.2 $\pm$ 21.6	86.5 $\pm$ 25.4 <sup>1)</sup>	51.2 $\pm$ 25.8 <sup>1)</sup>	47.7 $\pm$ 8.6 <sup>2)</sup>	31.7 $\pm$ 29.3 <sup>2)</sup>
干预 I 组	9	83.2 $\pm$ 15.7	72.1 $\pm$ 33.6	47.3 $\pm$ 18.5	28.9 $\pm$ 11.5 <sup>4)</sup>	25.6 $\pm$ 14.8 <sup>3)</sup>
干预 II 组	8	82.2 $\pm$ 19.7	68.7 $\pm$ 36.5	48.1 $\pm$ 22.6	26.4 $\pm$ 13.3 <sup>4)</sup>	21.5 $\pm$ 15.1 <sup>3)</sup>
Q 值			4.466 3	4.859 5	13.512 0	6.444 6

注: 与对照组比较, <sup>1)</sup>P<0.05, <sup>2)</sup>P<0.01; 与造模组比较, <sup>3)</sup>P<0.05, <sup>4)</sup>P<0.01

Note: Compared with control group, <sup>1)</sup>P<0.05, <sup>2)</sup>P<0.01; compared with model group, <sup>3)</sup>P<0.05, <sup>4)</sup>P<0.01

**2.1.2 大鼠空间探索实验所反映记忆能力的变化**  
各组大鼠在各象限跨越各相应平台次数的结果见表 2。与生理盐水组比较, 造模组大鼠在各象限跨越各相应平台次数明显减少 (P<0.01 或 P<0.05); 造模组与对照组比较, 在 I、II、III、IV 各平台象限跨越相应平台次数较对照组明显减少, 特别是在 I (Q=9.360 8, P<0.01)、IV 象限 (Q=11.438 0, P<0.01)

度定量分析, 计算相对系数=MPI 表达强度/ $\beta$ -actin 表达强度。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS13.0 统计软件, 对数据进行 Kolmogorov-Smirnov 正态分布检验和 Levene 方差齐性检验, 均满足正态分布和方差齐性条件。数据结果用均值 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多个样本均数比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 均数间两两比较采用 Student-Newman-Keuls 检验。P<0.05 表示有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Morris 水迷宫

**2.1.1 逃避潜伏期** 各组大鼠历时 5 d (共 40 次) 定位航行实验中每日平均逃避潜伏期的变化结果见表 1。统计分析以各组大鼠平均逃避潜伏期作为观察值, 以组别测试天数作为效应因子。各组大鼠均随着训练天数的增加, 逃避潜伏期逐渐缩短, 表明各组大鼠学习寻找平台的能力在历次的学习训练中均得到提高, 各组间逃避潜伏期在 5 d 中的总体变化具有可比性 (P<0.05)。两两比较发现: 与对照组比较, 造模组大鼠的逃避潜伏期较生理盐水组明显延长 (P<0.01), 显现出学习记忆力明显减退; 与造模组比较, 用药组逃避潜伏期明显缩短, 其中以依达拉奉干预 II 组最明显, 干预 I 组次之 (P<0.05), 显现出学习记忆能力明显提高; 用药组组间比较, 依达拉奉干预 II 组对于干预 I 组逃避潜伏期比较无显著差异 (P>0.05), 但潜伏期有不同程度的缩短。

更为明显; 与造模组比较, 各用药组在各象限跨越各相应平台次数不同程度增多, 其中以依达拉奉干预 II 组明显, 特别是在 I (Q=6.217 7, P<0.01) 和 IV 象限 (Q=5.921 6, P<0.01) 更多。

### 2.2 AD 大鼠海马 APP mRNA 的 RT-PCR 检测结果

**2.2.1 总 RNA 的甲醛-MOPS 凝胶电泳鉴定结果**  
总 RNA 经紫外分光光度法检测显示, 260/280

表2 大鼠至各象限跨越原平台的次数(次,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 2 The frequency of the rats to each quadrant(times,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数/只	至各象限跨越原平台的次数			
		I	II	III	IV
对照组	12	9.5±2.3	6.2±2.2	6.4±1.1	11.5±1.8
造模组	10	4.2±1.3 <sup>2)</sup>	3.8±1.5 <sup>1)</sup>	5.1±2.4	4.7±1.8 <sup>2)</sup>
干预I组	9	5.8±2.1 <sup>3)</sup>	5.5±3.4 <sup>3)</sup>	6.6±2.6	6.8±2.7 <sup>3)</sup>
干预II组	8	8.1±1.4 <sup>4)</sup>	6.7±1.5 <sup>3)</sup>	5.4±2.3	8.6±1.3 <sup>4)</sup>

注: 与对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; 与造模组比较, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$   
 Note: Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$

nmOD 值比值介于 1.8~2.0 之间, 5  $\mu\text{L}$  总 RNA 电泳鉴定可见 28 s, 18 s, 5 s 区带, 28 s 明显多于 18 s, 条带清晰, 无其他大分子条带, 表明总 RNA 无蛋白污染, 无降解。结果见图 1。

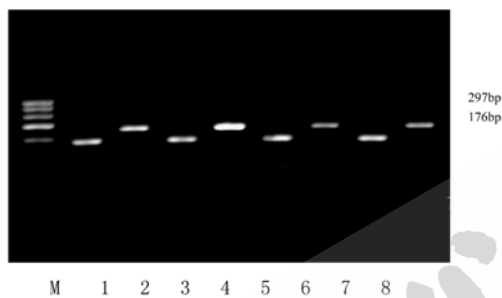


图1 大鼠脑组织 APP 基因扩增电泳照片  
 M-DNA 标记物(100~600 bp); 1, 2-干预 I 组; 3, 4-造模组; 5, 6-正常对照组; 7, 8-干预 II 组

Fig 1 APP mRNA expression of the hippocampus  
 M-DNA maker(100~600 bp); 1,2-3  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  group; 3,4-model group; 5,6-control group; 7,8-6  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  group

2.2.2 实验大鼠大脑海马部位 APPmRNA695 表达结果的变化及药物影响 造模组海马 APP mRNA695 表达明显高于正常对照组( $P<0.05$ ); 干预 I 组和干预 II 组均明显低于造模组( $P<0.05$ ); 干预 I 组和干预 II 组之间无明显差别( $P>0.05$ )。结果见表 3。

表3 四组大鼠脑 MPI 转录水平 (OD,  $\bar{x} \pm s$ )  
 Tab 3 Transcriptional level of MPI in 4 groups(OD,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数/只	MPI/ $\beta$ -actin
对照组	12	0.773±0.014
造模组	10	1.359±0.035 <sup>1)</sup>
干预 I 组	9	1.108±0.029 <sup>2)</sup>
干预 II 组	8	0.986±0.023 <sup>2)</sup>

注: 与对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与造模组比较, <sup>2)</sup> $P<0.01$   
 Note: Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P<0.01$

### 3 讨论

AD 是发病率最高的中枢神经系统退变性疾病

病, 主要表现为学习记忆能力的减退和分析、综合、理解、判断能力下降, 尤以近事遗忘为主。本实验从智力测试实验结果可知: 在 Morris 水迷宫定位航行实验中, 造模组大鼠每天逃避潜伏期都明显延长, 在空间探索实验中, 在各象限跨越相应平台次数明显减少, 说明造模组大鼠学习记忆能力严重受损, 明显下降, 提示该次自制 AD 大鼠模型具有学习记忆和空间探索能力下降的特点, 与 AD 临床表现极其相似, 证明了该次 AD 大鼠模型造模成功。

有大量的实验结果和临床资料表明<sup>[3]</sup>, A $\beta$  是各种原因诱发 AD 的共同通路, 是 AD 形成和发展的关键因素。分子克隆研究证明, A $\beta$  来自一分子量更大的  $\beta$ -淀粉样前体蛋白(APP)。A $\beta$  在 AD 中的作用机制涉及到复杂的分子机制, 主要包括促进自由基的形成, 破坏细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的稳态, 降低  $\text{K}^{+}$  通道功能, 增强致炎细胞因子引起炎症反应<sup>[4]</sup>。通过检测 APP mRNA, 从基因水平上研究 A $\beta$  聚集、沉积及对神经元产生毒性的真正机制, 目前在动物实验中作为反映 AD 病情进展的一个重要指标。

依达拉奉是一种强效的自由基清除剂, 其化学名称为: 3-甲基-1-苯基-2-吡唑啉-5-酮(3-Methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one)。依达拉奉能清除 NO, 通过多个途径减少自由基的产生<sup>[5]</sup>, 清除体内活性氧分子, 抑制脂质过氧化, 抑制血管内皮细胞的损害, 抑制脑水肿、改善神经症状, 抑制迟发性神经细胞死亡<sup>[6]</sup>。研究表明<sup>[7]</sup>, 老年性痴呆与脑细胞长期缺血缺氧有关, 国内外研究证明与自由基损伤、细胞因子等有一定关系。依达拉奉既能对抗氧自由基增强中枢神经耐缺氧能力, 又能减轻脑水肿, 降低颅内压。从而改善脑部缺氧缺血状况, 对痴呆症有良好的治疗效果。

现认为 APP 基因过表达是由于 APP 基因 5' 端附近存在数个调控子, 包括神经生长因子、白细胞介素-1、白细胞介素-2 和热休克因子, 它们在 AD 患者脑内的合成能力增加, 进而促进了 APP 基因的表达或过度表达。本实验研究结果显示依达拉奉能实现大鼠海马 APP 的基因表达的下调, 其作用机制可能在于扩张血管减轻外周阻力, 改善动静脉血供, 使脑组织内葡萄糖和氧得到充分利用, 提高了大脑所需能量, 刺激脑内很多神经递质及相关酶的活性, 下调神经生长因子、白细胞介素-1、白细胞介素-2 和热休克因子等各种活性因子的表达, 从而改善大脑功能和加强了语言、记忆、情绪等的功能, 其具

体机制有待进一步探讨。

本实验结果表明依达拉奉注射液对 AD 大鼠的学习记忆能力的改善确实有显著作用,对痴呆大鼠的信息获取能力和信息贮存能力都有明显的改善作用,能有效抑制 AD 大鼠海马内 APP mRNA695 的水平。提示依达拉奉可通过下调 APP mRNA695 的基因表达,从而有效抑制 A $\beta$ 启动的炎症和免疫联级反应,改善 AD 的病理过程。对大鼠海马 APP 基因表达的下调,提示依达拉奉治疗 AD 可通过多系统、多层次作用机制而发挥功效。

## REFERENCES

- [1] BAYER T A, WIRTHSO, MAJTENYI K, et al. Key factors in Alzheimer's diseases: beta-amyloid precursor protein processing. Metabolism and intraneuronal transport [J]. Brain Pathol, 2001, 11(1): 1-11.
- [2] COLE G M, FRAUTSCHY S A. Docosahexaenoic acid protects from amyloid and dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model [J]. Nutr Health, 2006, 18(3): 249-259.
- [3] MINOPOLI G, ZAMBRANO N, RUSSO T, et al. The cytosolic domain of APP and its possible role in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Ital J Biochem, 2006, 55(3/4): 205-211.
- [4] OHNO M. Genetic and pharmacological basis for therapeutic inhibition of beta- and gamma-secretases in mouse models of Alzheimer's memory deficits [J]. Rev Neurosci, 2006, 17(4): 429-454.
- [5] WANG W P, NIU G Z, JIN S, et al. Clinical observation on the Therapeutic effect of edaravone on cerebral infarction [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药理学), 2007, 24(2): 154-156.
- [6] ZHAO Q, DU J S, LIU S Y, et al. The effect of edaravone on the sod and mda in hippocampal tissue of rat with vascular dementia [J]. Mod Prev Med (现代预防医学), 2008, 34(10): 1950-1952.
- [7] ISERI P K, ALNITAS O, TOKAY T, et al. Relationship between cognitive impairment and retinal morphological and visual functional abnormalities in Alzheimer disease [J]. J Neuroophthalmol, 2006, 26(3): 18-24.

收稿日期: 2010-03-10