

神经节苷脂钠侧脑室注射对脑性瘫痪模型大鼠学习记忆能力的影响

罗秀玲¹, 赵峰¹, 胡睿婧¹, 陈德森²

(1. 十堰市太和医院, 湖北医药学院附属医院康复中心, 湖北 十堰 442000; 2. 湖北医药学院, 湖北 十堰 442000)

摘要:目的 观察侧脑室注射神经节苷脂钠对脑性瘫痪(CP)模型大鼠学习记忆能力的影响,探讨其治疗脑瘫的可能机制。方法 SD大鼠36只,分为空白对照组、模型组和神经节苷脂钠组($n=12$),采用手术切除大脑皮质和部分大脑组织的方法建立大鼠脑瘫动物模型。用大鼠脑定位仪侧脑室注射神经节苷脂钠给药3次(每10 d一次,注射3次),用水迷宫仪进行定位航行和空间探索实验学习记忆能力改变,悬吊试验和斜坡试验比较大鼠运动改变,并测定治疗前后脑组织液钙调蛋白(Calmodulin, CaM)及钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (Ca/calmodulin-dependent protein kinases or CaM kinases II, CaMK II),以研究神经节苷脂钠影响 CP 大鼠学习记忆能力的机制。结果 神经节苷脂钠组大鼠水迷宫中找到平台时间、斜坡试验时间显著缩短;悬吊试验时间、大鼠在第一象限和中环停留时间明显延长;定位航行中潜伏期和游泳距离缩短,脑组织液 CaM 及 CaMK II 增高,与模型组比较, $P<0.05$ 。结论 神经节苷脂钠能促进 CP 大鼠学习记忆能力,其作用机制可能与神经节苷脂钠抑制 CaM 及 CaMK II 合成,阻断 Ca^{2+} /CaM-CaMK II 信号传导通路,促进脑能量代谢,并抑制神经细胞膜钙内流和钙蛋白水解达到修复受损中枢神经,进而改善 CP 大鼠脑缺血缺氧状态并促进受损神经再生和神经组织功能的恢复。

关键词:大鼠;神经节苷脂钠;脑瘫动物模型;钙调蛋白及钙调蛋白依赖性蛋白激酶;学习记忆能力

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.01.008

Effect of injection of ganglioside sodium into cerebral ganglion on the behavior of model rats with cerebral palsy

LUO Xiuling¹, ZHAO Feng¹, HU Ruiqiang¹, CHEN Desen²

(1. Taihe Hospital, Department of Rehabilitation Center of Hubei University of Medical, Shiyan, Hubei 442000, China; 2. Hubei University of Medical, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of injection of sodium in the lateral ventricle on the neurological behavior in rats with cerebral palsy, and explore the possible mechanism of the treatment of cerebral palsy. **Methods** Thirty six SD rats were randomly divided into control group, model group and treatment group ($n=12$). The method of surgical resection of cerebral cortex and part of brain tissue was used to establish animal model of cerebral palsy in rats. Ganglioside sodium was injected in lateral ventricle three times by rat brain locator (once every 10 days for 30 days). The water maze testing apparatus for place navigation and space assay were performed to explore the changes in learning and memory. Suspension test and the test for slope is carried out to evaluate the change of motion. The level of anterior brain tissue fluid calmodulin (CaM) and calmodulin dependent protein kinase II (CaMK II) were evaluated explore the mechanism of ganglioside sodium effect in cerebral palsy rats learning memory. **Results** The duration of finding the platform in Morris water maze, slope test time of treatment group was significantly reduced; suspension, stay in first quadrant and central residence time was significantly prolonged; the latency and swimming distance in place navigation was shortened. The brain tissue CaM and CaMK II increased, compared with the model group, $P<0.05$. **Conclusion** Ganglioside sodium can promote learning and memory ability of cerebral palsy rats, which may correlated with ganglioside sodium down-regulating expression of CaM and CaM II mRNA, blocking Ca^{2+} /CaM-CaMK II signal transduction pathway, promoting brain energy metabolism and inhibiting nerve cell membrane calcium current and calcium protein hydrolysis to repair the damaged central nervous system (CNS), thus to regenerate the injured nerve and improve the cerebral palsy rats cerebral ischemia and hypoxia and the restoration of nerve function.

Key words: Rat; Ganglioside sodium; Animal model of cerebral palsy; Calmodulin and calmodulin dependent protein kinase signal pathway; Ability of learning and memory

脑性瘫痪(Cerebralpalsy, CP)又称脑瘫,新生儿

早产、羊水早破、病理性黄疸、低体质量、多胎、产伤窒息、缺氧缺血性脑病、感染脊髓灰质炎病毒等是其主要病因^[1-2]。这种脑损伤常造成小儿肢体残疾和智力发育,临床表现为持续存在的中枢性运动及躯体运动障碍性症候群^[3-4]。研究表明,神经节苷

基金项目:湖北省教育厅科学研究计划指导性项目(B2015474)

通信作者:陈德森,男,博士,副教授,研究方向:脑性瘫痪康复, E-mail:fenyanqin163163@126.com

脂钠具有保护神经细胞的作用,可通过稳定神经细胞膜的通透性,维持细胞钙离子平衡^[3]。还可通过调节脑组织中神经递质合成与释放、减轻兴奋性氨基酸对脑组织的神经毒性,促进神经细胞修复而减轻脑损伤^[5]。为更好的研究临床药物治疗,为临床用药提供理论基础,本实验通过建立大鼠脑瘫模型,经侧脑室注射神经节苷脂钠给药的方法,采用国内外公认的行为学检测方法作为鉴定 CP 模型的成模标准^[6],直接观察大鼠在水迷宫仪中的空间探索和定位航行能力,并用斜坡试验及悬吊试验来观察大鼠学习记忆能力的改变。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 SD 大鼠 36 只,雄性,体重 182 ~ 215 g,由十堰市太和医院动物中心提供[许可证 SYXK(鄂)2011-0031],动物手术在科技中心标准动物实验室完成[SCXK(鄂)2011-0008]。在进行实验前按随机数字表法将动物分为空白对照组、模型组和神经节苷脂钠组,各 12 只。

1.2 仪器与试剂 大鼠立体定位仪[轩泰仪(北京)科技有限公司,型号:XTY5105653];泰盟 Morris 水迷宫视频跟踪分析系统 WMT-100(成都泰盟软件有限公司,型号:WMT-100);神经节苷脂钠(北京赛升药业股份有限公司,批号 20093980);戊巴比妥钠(北京普博斯生物科技有限公司,批号:P3761)。

1.3 CP 大鼠模型制备方法 造模前用戊巴比妥钠(30 mg · kg⁻¹)腹腔注射麻醉三组大鼠,俯卧位固定于大鼠手术台,头顶剪毛备皮,碘伏消毒后用 75% 乙醇脱碘,铺无菌手术巾造模。模型组和神经节苷脂钠组造模时于颅顶骨正中切开皮肤,刮去颅顶骨骨膜,暴露矢状缝附近颅骨,然后用骨钻开窗(直径约 0.6 cm),切开硬脑膜,暴露大脑皮质,用眼科手术刀沿颅骨窗边缘切开大脑皮质(深约 4 mm),剥离出部分大脑髓质和大脑皮质,手术中避免损伤矢状窦,手术完成后用生理盐水冲洗创面,

无菌医用棉纱压迫止血。然后依次缝合皮下组织、皮肤,碘伏消毒。手术在 15 min 左右完成,术后 7 d 成模型^[7]。造模时于颅顶骨正中切开皮肤,刮去颅顶骨骨膜,暴露矢状缝,然后用骨钻开窗,不剥离出部分大脑髓质和大脑皮质,10 min 后分层缝合皮下组织作为对照组。

1.4 给药方法 将 CP 大鼠麻醉后固定于 ZS-B 型大鼠立体定位仪,用微量注射器将 20 μL 神经节苷脂钠准确注射于侧脑室内,10 d 一次,注射 3 次。

1.5 观察指标及方法 于神经节苷脂钠侧脑室注射的第 40 天,将动物放入 Morris 水迷宫中,用空间探索实验来观察 CP 大鼠运行轨迹,根据其在水迷宫中寻找平台时间来观察 CP 大鼠学习记忆能力^[8]。用测试运动的斜坡和悬吊试验台观察动物躯体平衡功能、肢体肌力运动功能^[9]。在第一次侧脑室注射神经节苷脂钠前和第 40 天,分别抽取 5 μL 脑室内脑组织液检测 CaM 和 CaMK II。

1.6 统计学方法 采用 SPSS19.0 软件进行统计学处理。实验数据为计量资料,均通过正态性检验,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较为单因素方差分析,两两比较为 HSD-*q* 检验。检验水准为 0.05。此外,本资料虽有部分涉及治疗前观测比较,但因重点为模型组和神经节苷脂钠组的比较,而该两组疗前资料非常相近,故不考虑采用协方差分析以校正其对症后的影响。

2 结果

2.1 神经节苷脂钠对大鼠脑组织液 CaM、CaMK II 的影响 见表 1。经整体分析(单因素方差分析),各指标的三组间差异有统计学意义($P < 0.05$),遂进行两两精细比较,并结合主要数据结果分析如下:对照组治疗前后脑组织液 CaM、CaMK II 含量无明显变化。模型组大鼠脑组织液 CaM、CaMK II 降低,与空白对照组比较, $P < 0.05$ 。神经节苷脂钠组大鼠治疗后脑组织液 CaM 和 CaMK II 增多,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 三组大鼠治疗前后 CaM、CaMK II mRNA 表达比较/(μmol · L⁻¹, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数/只	CaM		CaMK II	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
空白对照组	12	1.87 ± 0.15	1.84 ± 0.11	4.14 ± 0.24	4.98 ± 0.27
模型组	12	3.86 ± 0.21 ^a	3.70 ± 0.33 ^a	8.89 ± 0.41 ^a	9.87 ± 0.30 ^a
神经节苷脂钠组	12	3.90 ± 0.27 ^a	2.02 ± 0.27 ^b	8.08 ± 0.37 ^{ab}	3.25 ± 0.25 ^{ab}
<i>F</i> 值		351.028	195.231	643.626	1 891.129
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:1. 两两比较为 HSD-*q* 检验,与空白组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。2. 本资料重点比较模型组和神经节苷脂钠组。该两组疗前资料非常相近,故不考虑以协方差分析校正其对症后的影响。

2.2 神经节苷脂钠对大鼠随意运动的影响 见表2。经单因素方差分析,各指标的三组间差异有统计学意义($P<0.05$),两两比较并结合主要数据结果分析知:空白对照组大鼠斜坡试验发现其反应迅速,可及时掉头向上,用时短。大鼠悬吊时间较长,运动灵活、动作敏捷且准确。模型组大鼠斜坡试验发现其反应迟缓,不能及时掉头向上,掉头用时延长。大鼠右侧肢体无力,悬吊时间明显缩短,运动稳定性和灵活性明显降低。斜坡试验和悬吊试验与空白对照组比较, $P<0.05$ 。神经节苷脂钠组大鼠运动稳定性和灵活性好转,悬吊试验悬吊时间延长,斜坡试验掉头向上时间缩短,与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表2 三组大鼠治疗后悬吊试验和斜坡试验比较/ $\bar{x}\pm s$			
组别	鼠数/只	悬吊试验/min	斜坡试验/s
空白对照组	12	4.53±0.25	3.74±0.13
模型组	12	1.24±0.14 ^a	10.53±0.47 ^a
神经节苷脂钠组	12	5.01±0.27 ^{ab}	7.69±0.32 ^{ab}
<i>F</i> 值		974.995	1,227.086
<i>P</i> 值		0.000	0.000

注:两两比较为HSD-*q*检验,与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

2.3 神经节苷脂钠对大鼠定位航行影响 见表3。经方差分析,各指标的三组间差异有统计学意义($P<0.05$),再经两两比较并结合主要数据结果分析知:模型组大鼠潜伏期延长,游泳距离增加,与空白对照组比较, $P<0.05$ 。神经节苷脂钠组大鼠治

疗后潜伏期缩短,游泳距离明显明显缩短,与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 神经节苷脂钠对大鼠学习能力的影响 见表4。同前做整体分析,各指标的三组间均差异有统计学意义($P\leq 0.05$),两两比较并结合主要数据结果分析知:模型组大鼠学习找平台所需时间明显延长,停留在第一和第二相象限时间明显降低,中环停留长于内环及外环,与空白对照组比较, $P<0.05$ 。神经节苷脂钠组学习找平台所需时间明显缩短,停留在第一象限和中环的时间明显延长,与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

神经节苷脂钠是从猪脑中提取的具有保护受损神经细胞、促进受损中枢神经系统功能恢复的生物制剂。研究表明,神经节苷脂钠可与神经细胞膜结合,通过调节神经细胞膜Ca⁺-ATP酶和Na⁺-K⁺-ATP酶活性,稳定神经细胞膜的结构和功能,促进受损神经细胞能量代谢、减轻神经细胞水肿而达到“神经重构”(包括神经细胞的生存、轴突生长和突触生长)和保护神经的作用^[10-12]。临床上常用于脑梗死、CP、脑萎缩、脑出血、脊髓损伤、新生儿缺氧缺血性脑病及颅脑损伤性疾病^[13-14]。

在本实验中,模型组大鼠造模非常成功,在斜坡试验中大鼠反应迟缓,掉头向上时间延长或不能及时掉头向上。在悬吊试验中,模型组大鼠很快掉落,大鼠运动灵活性明显降低,运动稳定性差。在Morris水迷宫空间探索实验定位航行实验中,模型

表3 大鼠定位航行比较/ $\bar{x}\pm s$					
组别	鼠数/只	潜伏期/s		游泳距离/cm	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
空白对照组	12	50.04±9.29	49.19±10.95	602.57±56.24	609.60±60.33
模型组	12	122.63±13.29 ^a	136.40±21.29 ^a	1 027.29±96.22 ^a	908.68±91.34 ^a
神经节苷脂钠组	12	120.31±15.83 ^a	55.45±7.20 ^b	1 039.69±77.84 ^a	726.28±83.03 ^{ab}
<i>F</i> 值		119.351	136.253	120.663	43.334
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:(1)两两比较为HSD-*q*检验,与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;(2)本资料重点比较模型组和神经节苷脂钠组。该两组术前资料非常相近,故不考虑以协方差分析校正其治疗后的影响。

表4 神经节苷脂钠对大鼠大鼠空间探索的影响/ $\bar{x}\pm s$									
组别	鼠数/只	学习找平台时间/min	内环/s	中环/s	外环/s	第一象限/s	第二象限/s	第三象限/s	第四象限/s
空白对照组	12	3.37±0.15	9.54±0.76	57.23±8.37	55.20±6.20	41.35±7.04	35.71±4.74	23.36±3.67	24.64±4.99
模型组	12	7.44±0.40 ^a	17.44±1.22 ^a	49.41±5.13 ^a	43.69±5.45 ^a	33.00±3.69 ^a	24.57±4.32 ^a	20.17±3.60 ^a	21.28±5.06
神经节苷脂钠组	12	5.24±0.30 ^{ab}	15.95±1.92 ^{ab}	60.99±8.15 ^b	42.27±7.63 ^a	68.81±7.98 ^{ab}	26.64±3.71 ^a	19.41±3.15 ^a	20.31±2.53 ^a
<i>F</i> 值		550.759	110.215	7.712	14.333	99.563	23.013	4.348	3.255
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.021	0.050

注:两两比较为HSD-*q*检验,与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

组大鼠潜伏期延长,游泳距离增加,找平台所需时间和次数增多,在第一、二相象限停留时间降低且在中环停留长于内环和外环,这些都说明模型组大鼠随意运动障碍和学习记忆能力下降。出现以上与运动相关的改变主要是在造模型中,由于支配运动的大脑髓质和大脑皮质被部分切除,神经传导受阻,且在造模型过程中也会有部分神经细胞变性、坏死,这也会加重神经功能受损^[15]。在经侧脑室注射给药3次后,神经节苷脂钠组大鼠水迷宫中找平台次数减少,找到平台时间和悬吊试验掉头转向上时间显著缩短,大鼠在第一象限和中环停留时间明显延长,定位航行中潜伏期和游泳距离降低。说明侧脑室注射神给药治疗有效,CP大鼠的随意运动及学习记忆能力均增强。分析认为,侧脑室注射神经节苷脂钠吸收后,药物直接进入神经元细胞膜,可促进CP大鼠受损神经轴突生长和“神经重构”,并在药物的刺激作用下增加多种神经营养因子分泌而加快神经功能的恢复^[16]。我们在实验中观察到神经节苷脂钠组脑组织液CaM及CaMKⅡ降低,这可能是神经节苷脂钠阻断了CP大鼠中枢神经系统兴奋性氨基酸对神经元的毒性作用,选择性抑制谷氨酸过度激活引起的中枢神经病理改变^[17]。另一方面,外源性神经节苷脂能以稳定的方式与神经细胞膜结合,引起膜的功能变化。由于Ca²⁺作为胞浆内第二信使,与CaM形成Ca²⁺-CaM复合物后会进一步激活CaMKⅡ,这会改变CaMKⅡ酶的构象而加重钙超载^[18]。而钙超载会直接造成中枢神经细胞受损,神经节苷脂钠可抑制钙离子持续内流,减少细胞内钙离子浓度,减轻钙超载对神经细胞的损伤^[19]。这也有利于神经细胞膜结构和功能的稳定,也可增加神经生长因子的营养作用和对受损神经元的修复再生作用^[20]。

从实验结果来看,神经节苷脂钠能促进CP大鼠学习记忆能力,其作用机制可能与神经节苷脂钠降低脑组织液CaM及CaMKⅡ,抑制神经细胞膜钙内流和钙蛋白水解,阻断Ca²⁺/CaM-CaMKⅡ信号传导通路,促进脑能量代谢,并达到修复受损中枢神经,进而改善CP大鼠脑缺血缺氧状态并促进受损神经再生和神经组织功能的恢复。

参考文献

[1] 姚荣芳. 小儿脑性瘫痪的影响因素及护理对策探讨[J]. 安徽医药,2015,19(7):1401-1403.

- [2] 王春丽,龙旭浩. 50例脑性瘫痪患儿高危因素分析[J]. 中国中西医结合儿科学,2016,8(1):85-87.
- [3] 孙琦,王丹,刘海兵,等. 中医手法结合运动疗法治疗痉挛型脑性瘫痪临床研究[J]. 浙江中西医结合杂志,2016,26(1):6-9.
- [4] 汤明丽,吕复莉,唐久来,等. 小儿脑瘫康复治疗现状及进展[J]. 安徽医学,2012,33(9):1255-1257.
- [5] 汪新体,方侃. 单唾液酸四己糖神经节苷脂联合纳洛酮治疗新生儿缺氧缺血性脑病的疗效分析[J]. 实用药物与临床,2013,16(11):1027-1029.
- [6] 杨铭. 巴曲酶联合神经节苷脂治疗急性脑梗死的临床疗效分析[J]. 中国医药,2013,8(7):927-928.
- [7] XIE C,ZHOU K,WANG X,et al. Therapeutic benefits of de-layed lithium administration in the neonatal rat after cere-bral hypoxia-Ischemia[J]. PLoS One,2014,9(9):90-92.
- [8] 刘清忠,王大斌,韩丽梅,等. 侧脑室注射丹参酮对脑瘫模型大鼠神经行为学的影响[J]. 中国中医急症,2016,25(7):1281-1284.
- [9] 熊顺华,王燕,郭青平,等. 侧脑室注射吡咯喹啉酮对大鼠学习记忆的影响[J]. 中国老年学杂志,2011,31(2):266-268.
- [10] 俞雅珍,邓亚仙,高宝勤,等. 电损毁致大鼠痉挛性脑性瘫痪动物模型制备及其鉴定[J]. 实用儿科临床杂志,2007,22(12):928-930.
- [11] 李小强,陈莉峰. 单唾液酸四己糖神经节苷脂钠治疗脑卒中的疗效观察[J]. 河北医药,2013,35(18):2806-2828.
- [12] 梁达理. 单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射液治疗新生儿缺氧缺血性脑病[J]. 中国现代医生,2012,50(6):61-62.
- [13] 黄萍,郭俐宏,陈少秀,等. 电针联合穴位注射单唾液酸四己糖神经节苷脂钠对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国中医急症,2016,25(7):1335-1338.
- [14] 罗秀玲,戴欣钰,冯艳琴,等. 单唾液酸四己糖神经节苷脂钠穴位注射联合针刺对新生儿缺血缺氧性脑病RCBF及CK-BB的影响[J]. 中国中医急症,2016,25(3):400-407.
- [15] 涂博,张红梅,宋高飞,等. 小脑顶核电刺激联合系统康复锻炼治疗小儿脑瘫的临床效果分析[J]. 安徽医药,2016,20(4):754-755.
- [16] 韩蕾. 康复锻炼联合神经节苷脂治疗小儿脑性瘫痪的疗效观察[J]. 中国实用神经疾病杂志,2015,18(5):43-44.
- [17] 李霞,任莉,陈振辉,等. 神经节苷脂头部穴位注射佐治小儿脑性瘫痪临床研究[J]. 中国中西医结合儿科学,2010,2(5):441-442.
- [18] 张丽,杨艳,曾晓荣,等. 小电导钙激活钾通道磷酸化相关调节及其在心血管疾病中的作用[J]. 中国心血管病研究,2012,10(10):624-627.
- [19] 牛亚飞,赵广春. 神经节苷脂治疗脑性瘫痪40例疗效观察[J]. 中国现代医生,2012,50(6):150-152.
- [20] 胡冰凌,周勇,刘强,等. 神经节苷脂对脑出血患者血清髓鞘碱性蛋白及凝血酶的影响[J]. 实用药物与临床,2015,18(8):936-938.

(收稿日期:2016-05-20,修回日期:2016-11-06)