

α -硫辛酸合锌对痴呆模型小鼠学习记忆能力的影响

张 迪 李 燕 罗 瑛 田卫群 周青山

摘 要 **目的** 观察 α -硫辛酸合锌对东莨菪碱致痴呆模型小鼠学习记忆能力及氧化应激的影响。**方法** 将 32 只昆明小鼠随机均分成模型对照组、硫辛酸组、硫酸锌组、 α -硫辛酸合锌组。每组每天分别给予生理盐水、硫辛酸、硫酸锌和 α -硫辛酸合锌,每次给药 5h 后进行 Y 迷宫训练,连续 8 天后各组均给予 5mg/kg 东莨菪碱,半小时后进行记忆能力测试。测定小鼠匀浆后脑组织内还原型谷胱甘肽和蛋白含量及超氧化物歧化酶的活力。**结果** 与模型对照组及其他各组相比, α -硫辛酸合锌组小鼠错误次数明显减少,脑组织内还原型谷胱甘肽和蛋白质含量明显升高 ($P < 0.05$),超氧化物歧化酶活力明显降低 ($P < 0.01$)。**结论** α -硫辛酸合锌可以显著提高痴呆小鼠的学习记忆能力,降低脑组织内氧化应激水平。

关键词 α -硫辛酸合锌 东莨菪碱 学习记忆 氧化应激

中图分类号 R741 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.05.024

Effects of Zinc α -lipoate Complex on the Learning and Memory Abilities of Scopolamine-induced Amnesia Mice. Zhang Di, Li Yan, Luo Ying, et al. Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract **Objective** To investigate effects of zinc α -lipoate complex on the learning and memory abilities as well as the oxidative stress in scopolamine-induced amnesia mice. **Methods** A total of 32 mice were randomly divided into the model control group, the group with α -lipoic acid, the group with zinc sulfate, the group with zinc α -lipoate complex. rats in each group were administered corresponding drugs and trained with Y-maze five hours later. After 8 days, Rats in each group received the celiac injection of the scopolamine at a dose of 5mg/kg. After half an hour, the memory ability was tested, and then the mice were decapitated. The content of GSH and protein, the activity of SOD in the cerebral tissue were determined. **Results** Compared with the model control group and other groups, the zinc α -lipoate complex can decrease the false times and the activity of SOD ($P < 0.01$) in the cerebral tissue, while increase the content of GSH ($P < 0.01$) and protein ($P < 0.05$). **Conclusion** The zinc α -lipoate complex can improve the learning and memory abilities and decrease the level of oxidative stress in the cerebral tissue of amnesia mice.

Key words Zinc α -lipoate complex; Scopolamine; Learning and memory; Oxidative stress

阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 是一种发生率与年龄相关、以记忆力减退和认知功能障碍为特征的神经退行性疾病^[1]。认知和记忆障碍的主要解剖学基础为海马组织结构的萎缩,功能基础主要为胆碱能神经兴奋传递障碍和中枢神经系统内乙酰胆碱受体变性、神经元数目减少,其发病机制可能与氧化应激有关。 α -硫辛酸 (α -lipoic acid, α -LA) 是一种抗氧化剂,能清除自由基,再生内源性的抗氧化剂如还原型谷胱甘肽、维生素 C、维生素 E、辅酶 Q 等,并与其构成机体的抗氧化剂网络,共同发挥较强的协同作用。临床研究表明, α -硫辛酸可以减缓 AD 患者的病情进展^[2]。锌作为人体必须的微量元

素,在抗氧化过程中发挥着重要的作用。它能够稳定细胞膜,阻止活性氧的产生,是许多抗氧化酶的重要组成部分,如超氧化物歧化酶 (SOD) 等,同时作为转运蛋白参与氧化应激介导的病理过程的调节。可以维持细胞凋亡和衰老之间的平衡,改善免疫功能^[3]。 α -LA 是一种两溶性的化合物,具有螯合金属离子的能力。 α -LA 与锌螯合形成的 α -硫辛酸合锌对学习记忆能力的影响目前尚未见报道。本研究旨在探讨 α -硫辛酸合锌对东莨菪碱 (scopolamine, SCOP) 诱发痴呆小鼠学习记忆能力及氧化应激的影响。

材料与方法

1. 主要试剂与仪器: α -硫辛酸,江苏省神州化学工业有限公司生产;氢溴酸东莨菪碱,徐州莱恩药业有限公司生产;超氧化物歧化酶测试盒,南京建成生物工程研究所生产;5,5-二硫代双(2-硝基苯酸) (DTNB),上海芸萃生物科技有限公司; α -硫辛酸合锌 (本实验室合成);美国 Sonic VBO 超声细胞破碎仪;MG-2 迷宫,张家港市生物医学一仪器厂;UV-

作者单位:430060 武汉大学人民医院 (张迪、罗瑛、周青山);湖北省荆州市第一人民医院 (李燕);武汉大学基础医学院 (田卫群)

通讯作者:周青山,主任医师,电子信箱:elishanxiu@sina.com

9200 紫外可见分光光度计,北京瑞丽分析仪器公司。

2. 动物分组及给药:雄性昆明小鼠 32 只,体重 20 ~ 25g,由武汉大学动物实验中心提供。自由进食、饮水,自然昼夜节律光照。将小鼠随机分为 4 组,即模型对照组(A 组)、 α -硫辛酸组(B 组)、硫酸锌组(C 组)、 α -硫辛酸合锌组(D 组)。每日 10 时 B 组给予硫辛酸 140mg/kg 灌胃, C 组给予硫酸锌 442mg/kg 灌胃, D 组给予 α -硫辛酸合锌 180mg/kg 灌胃, A 组给予等容量生理盐水,每次给药 8h 后各组小鼠进行 Y 型迷宫训练,如此持续 8 天。

3. 小鼠 Y 型迷宫学习^[4]:取实验小鼠每晚 6 时进行 Y 型迷宫训练。实验时先将小鼠放入迷宫中适应 3min,然后采取随机休息法开始正式实验:无规则次序变换安全区,以训练小鼠辨别安全方位的能力。小鼠受电击后逃到安全区后,灯光继续作用 10s,熄灯后结束一次测试。小鼠所在支臂就作为下一次测试的起点,依次重复 10 次。小鼠在 10s 内直接到达安全区认为是正确的。将小鼠第 6、7 天和 8 天到达安全区的平均正确次数作为注射 SCOP 前的学习成绩。

4. 记忆测试:末次训练 24h 后各组小鼠腹腔注射 SCOP 5mg/kg 建立学习记忆障碍模型,注射半小时后分别进行迷宫试验,试验方法同上,记录每只小鼠行为学测试结果并比较注射 SCOP 前后各组小鼠到达安全区的正确次数。

5. 生化指标检测:行为学测试结束后,小鼠眼球放血、断椎处死,取脑组织并用生理盐水洗去残留血液和其他附着物,吸干后精确称重。剪碎脑组织并加 9 倍脑组织重量的生理盐水,用匀浆机匀浆后即得到 10% 的脑匀浆备用。采用 DTNB 法测定脑组织中还原型谷胱甘肽(GSH)的含量。采用考马斯亮蓝法测定脑组织蛋白的含量。按试剂盒说明书步骤测定脑组织中超氧化物歧化酶的活力^[5,6]。

6. 统计学方法:实验数据采用 SPSS 16.0 版统计软件包处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组均数比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Y 型迷宫测试成绩比较:各组小鼠注射 SCOP 前学习成绩如图 1 所示,硫酸锌组和 α -硫辛酸合锌组比模型对照组和 α -硫辛酸组正确次数明显增加。各组小鼠注射东莨菪碱后学习成绩如图 2 所示,注射 SCOP 后硫酸锌组和 α -硫辛酸合锌组比模型对照组和 α -硫辛酸组错误次数少。各组小鼠注射 SCOP 前后学习成绩比较如图 3 所示,注射 SCOP 前后 α -硫辛酸合锌组小鼠学习成绩无明显变化,而其余各组小鼠注射 SCOP 前后到达安全区的正确次数差异较大。

2. 各组小鼠脑组织内还原型谷胱甘肽和蛋白含量测定:各组小鼠脑组织还原型谷胱甘肽和蛋白含量测定结果见表 1。 α -硫辛酸组、硫酸锌组的 GSH 和蛋白含量与模型对照组相比差异均无统计学意义。

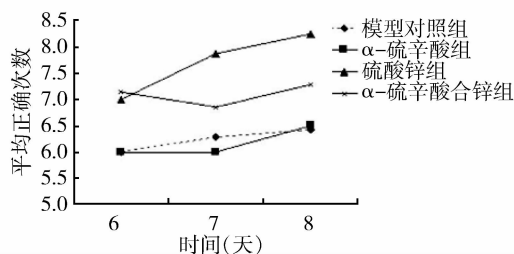


图 1 注射 SCOP 前各组小鼠平均正确次数比较

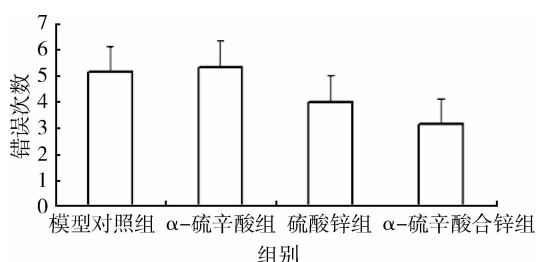


图 2 注射 SCOP 后各组小鼠错误次数比较

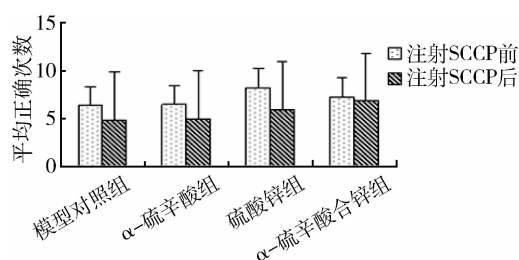


图 3 各组小鼠注射 SCOP 前后正确次数比较

硫辛酸合锌组 GSH 含量明显高于模型对照组 ($P < 0.01$), 蛋白含量也显著高于模型对照组 ($P < 0.05$)。 α -硫辛酸合锌组 GSH 含量显著高于 α -硫辛酸组 ($P < 0.01$) 和硫酸锌组 ($P < 0.05$), α -硫辛酸合锌组的蛋白含量也显著高于 α -硫辛酸组和硫酸锌组 ($P < 0.05$)。

3. 各组小鼠脑组织内超氧化物歧化酶活力测定:各组小鼠脑组织超氧化物歧化酶活力测定结果见表 1。 α -硫辛酸组 SOD 活力显著低于模型对照组 ($P < 0.05$), 而硫酸锌组与模型对照组相比无明显差异。 α -硫辛酸合锌组 SOD 活力显著低于模型对照组、 α -硫辛酸组和硫酸锌组 ($P < 0.01$)。

讨 论

伴随着社会人口老龄化,老年痴呆症发生率呈逐年上升趋势,其发病危险因素主要有高龄、高血压、高胆固醇、糖尿病、吸烟、饮酒过度、抑郁、文化层次低、缺乏早期教育、环境压力、头部外伤等^[7]。AD 是痴呆最常见的类型,2013 年世界 AD 报告指出,全球 AD

表 1 各组小鼠脑组织 GSH 含量、蛋白含量、SOD 活力比较

组别	n	GSH 含量 (mg/L)	蛋白含量 (mg/ml)	SOD 活力 (U/mg prot)
模型对照组	8	29.20 ± 3.40 ^{△△}	0.10 ± 0.01 [△]	340.65 ± 46.92 ^{△△}
α - 硫辛酸组	8	29.30 ± 3.03 ^{△△}	0.11 ± 0.01 [△]	281.74 ± 39.53 ^{*△△}
硫酸锌组	8	31.42 ± 3.67 [△]	0.10 ± 0.01 [△]	310.60 ± 63.10 ^{△△}
α - 硫辛酸合锌组	8	35.26 ± 1.76 ^{**}	0.16 ± 0.04 [*]	203.03 ± 144.52 ^{**}

与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 α - 硫辛酸合锌组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

患者已超过 3000 万,到 2050 年 AD 患者的总人数将是现在的 3 倍多^[8]。目前,胆碱能学说是 AD 发病较为公认的学说之一。胆碱能系统的活性与人的学习记忆及认知活动过程密切相关。基底前脑胆碱能神经元、海马和皮质及它们之间的通路,是学习记忆功能的重要结构基础。AD 患者脑内胆碱能神经元受损明显,受损程度与患者认知功能损害的程度呈正相关。东莨菪碱为 M 胆碱受体拮抗剂,急性腹腔注射东莨菪碱可选择性地破坏损伤动物的空间记忆能力。东莨菪碱的这种作用被认为是突触后 M₁ 受体传递被阻滞,破坏了海马的记忆能力,可模拟 AD 患者的记忆缺失,因此作为快速、简单的胆碱能损失模型。谷胱甘肽由还原型谷胱甘肽 (GSH) 和氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 组成,两种形式可以互变,两者的正常比例约为 100:1, GSH 在细胞抗氧化作用中具有重要意义。轻度认知障碍和 AD 的发生和发展过程中伴随着氧化应激^[9]。而当机体处于氧化应激状态时, GSH 立即产生应激反应,直接清除自由基,减少自由基生成,调节离子分布,抑制细胞因子合成,减少效应细胞活化,减轻靶细胞损伤,调节凋亡相关基因的平衡等,对维持细胞的正常代谢、保护细胞膜的完整性具有重要的生化功能^[10]。

α - 硫辛酸不仅能够清除机体活性氧,降低机体氧化应激的水平,还能提高组织内 GSH 的浓度,并能防止组织氧化损伤后的 GSH 急剧减少^[11]。有研究显示 α - 硫辛酸可以提高小鼠的学习和记忆能力^[12, 13]。锌是许多抗氧化酶的重要组成成分,能够发挥抗氧化的功能。本研究结果显示, α - 硫辛酸合锌组小鼠脑组织中 GSH 的含量极显著地高于模型对照组、α - 硫辛酸组和硫酸锌组。这可能是由于脂溶性的 α - 硫辛酸将锌离子带入细胞内,提高了胞内 Zn²⁺ 浓度,使锌能够更充分的发挥抗氧化功能,提示 α - 硫辛酸与锌结合可能具有抗氧化协同的作用。小鼠分别给予 α - 硫辛酸、硫酸锌、α - 硫辛酸合锌连续灌胃 8 天后,脑组织中 GSH 含量依次增加,导致机体组织包括脑组织在内的抗氧化能力依次增强。随

着脑组织内 GSH 水平的逐渐增加,除了脑内非酶类 GSH 和锌离子可发挥一定的抗氧化应激作用外, α - 硫辛酸本身又是一种极好的内源性的抗氧化剂, α - 硫辛酸和锌离子的结合具有抗氧化协同作用,其抗氧化作用比单独补充 α - 硫辛酸、硫酸锌显著地增强,机体的氧化应激水平因此会相应地降低。

SOD 是抗氧化防御体系中一类重要的金属酶类,它随着体内氧化应激水平高低而发生相应改变。当机体组织内氧化应激处于较低水平时,此时测定其组织中 SOD 的活性也会因体内氧化应激负反馈调节作用而减弱,在本实验中硫酸锌组 SOD 活力高于硫辛酸组更高于硫辛酸合锌组。α - 硫辛酸合锌组 GSH 的含量与蛋白含量均最高,提示锌与 α - 硫辛酸的螯合物能更好地促进蛋白合成,保护蛋白质的结构和功能。行为学试验结果显示模型组小鼠注射 SCOP 后错误次数明显增加,说明注射 SCOP 造成了学习和记忆障碍,补充 α - 硫辛酸合锌后错误次数明显减少,说明 α - 硫辛酸合锌具有改善学习、记忆障碍的作用,其机制可能包括两个方面:一方面 α - 硫辛酸合锌能够降低机体氧化应激水平,保护脑组织免受自由基的攻击;另一方面 α - 硫辛酸合锌还能促进脑组织蛋白的合成,而大脑皮质是学习与记忆的物质基础,在学习记忆的过程中,脑内蛋白质的合成增加,通过新合成的蛋白质将新获得的经验贮存下来^[14]。本实验采用 Y 型迷宫对小鼠进行学习记忆能力测试,该方法本身还存在一定的局限性。关于 α - 硫辛酸合锌改善学习记忆能力的具体分子生物学机制还有待于进一步探讨。

参考文献

1 Fargo K, Bleiler L. 2014 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2014, 10(2): e47 - 92

2 Hager K, Kenklies M, McAfoose J, *et al.* Alpha - lipoic acid as a new treatment option for Alzheimer's disease - a 48 months follow - up analysis [J]. *J Neural Transm Suppl*, 2007, 72: 189 - 193

3 Chasapis CT, Loutsidou AC, Spiliopoulou CA, *et al.* Zinc and human health: an update [J]. *Arch Toxicol*, 2012, 86(4): 521 - 534

4 郭德玉, 王钜, 李林, 等. 药理研究中常用学习记忆障碍动物模

- 型的行为学分析[J]. 实验动物科学, 2007, 24(1): 1-5
- 5 夏奕明, 朱莲珍. 血和组织中谷胱甘肽过氧化物酶活力的测定方法 I. DTNB 直接法[J]. 卫生研究, 1987, 4: 29-33
 - 6 江南, 黄强. 一种简便的考马斯亮蓝 G250 蛋白质染色方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(5): 560-561
 - 7 章莹, 付伟. 国外老年痴呆症预防研究现状[J]. 实用老年医学, 2014, 28(8): 685-686
 - 8 Sosa-Ortiz AL, Acosta-Castillo I, Prince MJ. Epidemiology of dementias and Alzheimer's disease [J]. Arch Med Res, 2012, 43(8): 600-608
 - 9 Pocernich CB, Butterfield DA. Elevation of glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer disease [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1822(5): 625-630
 - 10 李斌晨, 吴明营, 蒙革, 等. 还原型谷胱甘肽临床研究及应用进展[J]. 中国医疗前沿, 2008, 3(6): 9-10
 - 11 Shinto L, Quinn J, Montine T, *et al.* A randomized placebo-controlled pilot trial of omega-3 fatty acids and alpha lipoic acid in Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2014, 38(1): 111-120
 - 12 Galasko DR, Peskind E, Clark CM, *et al.* Antioxidants for Alzheimer disease: a randomized clinical trial with cerebrospinal fluid biomarker measures [J]. Arch Neurol, 2012, 69(7): 836-841
 - 13 Farr SA, Price TO, Banks WA, *et al.* Effect of alpha-lipoic acid on memory, oxidation, and lifespan in SAMP8 mice [J]. J Alzheimers Dis, 2012, 32(2): 447-455
 - 14 梁海清, 田少鹏, 廖惠芳, 等. 益脑胶囊对小鼠脑组织蛋白含量及 CHE 活性的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 5: 342-343

(收稿日期: 2014-10-21)

(修回日期: 2014-11-13)

256 层螺旋 CT 在肺撕裂伤诊断中的应用

赵鹤亮 项 昆 赵新斌 张惠英

摘 要 **目的** 总结肺撕裂伤的影像学特征及损伤机制、演变规律。**方法** 选取符合标准的肺撕裂伤患者 32 位患者 48 处病灶的 CT 图像进行回顾性分析。**结果** 圆形/类圆形组病灶与不规则形组病灶分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 并不是所有的病例, 都必须经过气囊、气液囊、血肿 3 个阶段; 32 处病灶靠近胸膜下, 16 处位于非胸膜下, 比较不同演变形式肺撕裂伤病灶的分布情况, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 肺组织实变加重可使病灶缩小或消失; 所有病灶复查中均未继续增大。**结论** 肺撕裂伤的 3 个演变形式为气囊、气液囊、血肿, 256 层螺旋 CT 及其后处理技术可以较好的观察肺撕裂伤的形态分布等特征, 对于及时正确诊断具有重要价值。

关键词 X 线计算机 体层摄影术 肺撕裂伤

中图分类号 R655

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.05.025

Application of 256 Slice Spiral CT in the Diagnosis of Pulmonary Laceration. Zhao Heliang, Xiang Kun, Zhao Xinbin, *et al.* CT Room, Affiliated Hospital of Hebei United University, Hebei 063000, China

Abstract Objective To evaluate the imaging characteristics and the damage mechanism and evolution of lung laceration. **Methods** Standard pulmonary lacerations from 32 patients were chosen and CT images of 48 lesions were analyzed retrospectively. **Results** Significant differences distribute between round/round-like lesion group and irregular group ($P < 0.05$). Not all cases must be approved by the balloon, gas liquid capsule, and hematoma. Thirty-two cases were close to the pleura, and 16 cases were in non subpleural. There were no significant differences in comparing the distribution between different evolutions of lung laceration lesion ($P > 0.05$). Lesions will either shrink or disappear with the increase of lung tissue consolidation. All lesions in the revision did not show any sign of continuing to increase. **Conclusion** Three stages of lung laceration will be involved as the balloon, the gas-liquid capsule, and hematoma. Totally 256-slice spiral CT and post processing technology can be used to observe the laceration of lung morphology distribution, and has significant value in the diagnosis timely and correctly.

Key words X-Ray; Computed tomography; Lung laceration

基金项目: 唐山市科技局科技指令性计划项目 (13130273z); 河北联合大学青年科学基金资助项目 (z201229)

作者单位: 063000 唐山, 河北联合大学附属医院 CT 室 (赵鹤亮、赵新斌、张惠英); 唐山市协和医院 CT/MR 室 (项昆)

肺撕裂性损伤多由钝性创伤所致, 为严重的胸部损伤, CT 是诊断及动态观察肺撕裂伤的最佳影像方法, 如对该病影像学征象认识不足, 可混淆诊断甚至误诊。胡晓峰等^[1]及闵智乾等^[2]对肺撕裂伤后出现