

# 巴曲酶对大鼠颞叶梗塞后学习障碍的改善作用

杨炯炯 隋南 Albert Chen 匡培梓 吴卫平 姜树军 匡培根

**【摘要】** 目的 研究巴曲酶对大鼠左侧颞叶梗塞后空间学习障碍的改善作用。方法 采用立体定向光化学诱导脑梗塞技术选择性地导致大鼠左侧颞叶皮层梗塞,术前 30 分钟及术后第 3 天分别给巴曲酶组大鼠腹腔注射巴曲酶 8 BU/kg,行为实验装置由 Morris 水迷宫及图像自动监视系统组成。结果 (1)巴曲酶可以显著地缩短梗塞大鼠在 Morris 迷宫中搜索目标的平均反应时和行程;(2)巴曲酶组大鼠较多、较早地使用了正常的认知策略。结论 巴曲酶对左侧颞叶梗塞大鼠空间认知功能障碍具有明显的改善作用。它除了溶栓作用外,还参与了神经损伤的修复过程。

**【关键词】** 巴曲酶 脑梗塞 空间认知 Morris 迷宫

**Effects of batroxobin on learning disorder in rats after temporal infarction** Yang Jiongjiang, Sui Nan, Albert Chen, et al. Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101

**【Abstract】 Objective** To study the effects of batroxobin on spatial learning disorder in rats after left temporal infarction. **Methods** Left temporal infarction was induced by stereotactic light chemistry. 30 minutes before the operation and the third day after the operation, the rats in batroxobin group were treated by batroxobin 8 BU/kg. The behavioral apparatus was consisted of Morris water maze and Morris Maze Experimental Assistant System. **Results** (1) Batroxobin might shorten the mean reaction time and distance of rats with infarction in Morris water maze. (2) Rats in batroxobin group used normal strategies more often and earlier. **Conclusion** Batroxobin improved spatial cognition disorder of the left temporal infarct rats. Besides the thrombolytic effect, it might be involved in the restoration process of nerve injury.

**【Key words】** Batroxobin Cerebral infarction Spatial cognition Morris water maze

巴曲酶(Batroxobin)是一种纯化的单成分蛇毒酶制剂,由于它可以有效地抑制血栓形成并溶解血栓,近年来用于治疗急性缺血性脑血管病并取得显著疗效。新近报道巴曲酶还通过许多途径参与神经保护过程,如它可以清除自由基,调节脑组织中兴奋性氨基酸的含量,降低缺血再灌注时NO的神经毒性作用,下调c-fos基因表达,降低脑组织内精氨酸加压素(AVP)的含量,并使热休克蛋白HSP70的表达在缺血再灌注的12小时~6天时增多,使碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)样免疫反应增强等<sup>[1-4]</sup>。虽然对巴曲酶有许多关于作用机理研究的报道,但脑缺血发生后,它们对行为障碍的持续改善作用尚缺乏系统的研究。

有研究报道巴曲酶可以缩短梗塞大鼠水迷宫学习的反应时,减少在跳台实验中遭电击的时间<sup>[5]</sup>。但是水迷宫和Morris水迷宫是不同的行为模式,水迷

宫测定的是动物以自我为参照点的认知方式,而在Morris水迷宫中寻找隐蔽的固定位置的站台时,正常大鼠所采用的行为方式则是以异我为参照点的;另外,Morris迷宫可以提供较多的实验参数,系统而全面地考察大鼠空间认知加工过程的变化,尤其可将学习记忆障碍和感觉、运动、动机等缺损分离开来<sup>[6]</sup>,因此本实验应用Morris迷宫进一步探讨巴曲酶对大鼠单侧颞叶皮层梗塞后空间认知加工过程的改善作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及分组 成年雄性Wistar大白鼠

作者单位: 100101 中国科学院心理研究所(杨炯炯 隋南 匡培梓); 中国人民解放军总医院神经介质实验室(吴卫平 姜树军 匡培根); Department of Psychology, University of Michigan, U SA (Albert Chen)

国家自然科学基金、中科院留学回国择优基金、国家科委中科院匹配项目及军队九五M125基金项目资助

(北京医科大学动物中心提供)共 30 只,实验起始体重 200 ± 20 g,随机分为 3 组,梗塞对照组、巴曲酶组、假手术组各 10 只。实验期间摄食饮水自由,全部行为训练都在 10:00 Am ~ 5:00 Pm 之间完成。

### 1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备 采用新型的立体定向光化学诱导脑梗塞技术。将大鼠麻醉后,固定在立体定位仪上,从尾静脉注射玫瑰红(RB, 20 mg/kg),切开头皮,确定颞叶位置,用光导纤维引导冷光,定向照射与左侧颞叶相应的裸露颅骨 20 分钟,造成局灶性颞叶梗塞<sup>[7]</sup>。术前 30 分钟巴曲酶组大鼠腹腔注射巴曲酶(东菱精纯克栓酶, 8 BU/kg, 日本东菱药品工业株式会社生产),梗塞对照组则注射同等剂量的生理盐水。术后第 3 天给各组大鼠追加注射同等剂量的药物。假手术组大鼠仅进行了麻醉和手术切口。术后伤口处抗感染。

1.2.2 行为实验装置 由 Morris 水迷宫及图像自动监视系统(Morris Maze Experimental Assistant System, MM EAS)组成。Morris 水迷宫为乳白色不透明圆柱形储水池(d= 94 cm, h= 55 cm),内设透明有机玻璃小站台(s= 20 cm<sup>2</sup>)。MM EAS 系统以图像采集卡、摄像机、图像监视器等为主要扩展硬件,利用图像软件包提供的各层次库函数可完成数据采集和统计处理。有关实验装置详见已发表论

文<sup>[8]</sup>。

1.2.3 行为实验程序 各组大鼠从术后第 4 天开始行为实验,连续 5 天。实验分为两个阶段:预训练(1 天)及训练(4 天),大鼠共接受训练 24 次,每天 6 次,每次间隔 15 分钟。大鼠在除站台外的其它三个象限边缘头朝池壁入水,每一次入水位置是假性随机的。MM EAS 自动追踪大鼠游泳轨迹,并记录各项实验数据。实验指标有:(1)反应时(s);(2)行程(cm);(3)搜索策略:分为随机式、边缘式、趋向式、直线式。

1.2.4 数据处理 反应时、行程以 3 次训练成绩为 1 个组次取平均值,训练 4 天,共 8 个组次。实验数据采用 SPSS 软件包进行方差分析和 X<sup>2</sup> 检验。

## 2 结果

2.1 反应时的比较 见表 1。梗塞组、巴曲酶组及假手术组各组大鼠的组次间平均反应时差异均具有显著性,各组大鼠的反应时均随学习组次的增加而缩短,在第 6 组次时三组的反应时已十分接近。组间比较发现,各组大鼠在第 1~ 3 组次时的反应时具有显著差异。进一步两两比较可见,梗塞组与假手术组、巴曲酶组大鼠相比差异均具有显著性,而巴曲酶组和假手术组之间没有明显差别。

表 1 各组大鼠在第 1~ 8 组次的平均反应时比较( $\bar{x} \pm s, s$ )

|      | 第 1 组次         | 第 2 组次         | 第 3 组次         | 第 4 组次        | 第 5 组次        | 第 6 组次      | 第 7 组次       | 第 8 组次      |
|------|----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|-------------|--------------|-------------|
| 梗塞组  | 44.50 ± 51.14* | 44.73 ± 65.24* | 22.60 ± 18.31* | 13.90 ± 17.01 | 13.27 ± 10.60 | 6.77 ± 4.02 | 9.13 ± 10.52 | 8.73 ± 9.43 |
| 巴曲酶组 | 15.73 ± 15.16  | 12.87 ± 7.47   | 9.20 ± 5.23    | 10.03 ± 5.96  | 9.70 ± 7.23   | 7.90 ± 5.58 | 8.33 ± 6.30  | 7.30 ± 4.09 |
| 假手术组 | 20.47 ± 16.55  | 18.50 ± 13.84  | 10.43 ± 9.45   | 11.80 ± 10.98 | 10.17 ± 6.62  | 6.80 ± 3.70 | 7.60 ± 6.64  | 7.80 ± 6.23 |

梗塞组与巴曲酶组比较\* P < 0.05, 梗塞组与假手术组比较 P < 0.05

表 2 各组大鼠在第 1~ 8 组次的平均搜索行程比较( $\bar{x} \pm s, cm$ )

|      | 第 1 组次           | 第 2 组次          | 第 3 组次           | 第 4 组次          | 第 5 组次          | 第 6 组次          | 第 7 组次          | 第 8 组次          |
|------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 梗塞组  | 663.00 ± 647.09* | 541.43 ± 698.82 | 458.93 ± 400.99* | 318.90 ± 347.85 | 256.43 ± 184.94 | 144.03 ± 79.71  | 190.07 ± 196.63 | 189.53 ± 216.53 |
| 巴曲酶组 | 298.07 ± 294.18  | 271.03 ± 163.27 | 215.60 ± 133.93  | 240.13 ± 139.98 | 180.73 ± 105.88 | 156.13 ± 105.53 | 154.30 ± 94.81  | 153.23 ± 77.89  |
| 假手术组 | 370.97 ± 417.20  | 383.20 ± 362.25 | 193.87 ± 134.19  | 239.20 ± 189.03 | 178.63 ± 123.36 | 135.43 ± 60.12  | 161.63 ± 142.83 | 159.73 ± 106.11 |

梗塞组与巴曲酶组比较\* P < 0.05

2.2 行程的比较 见表 2。梗塞组、巴曲酶组和假手术组各组大鼠组次间的平均搜索行程差异具有显著性,总的趋势是随着学习组次的增加搜索行程逐渐

缩短,至第 6 组次时各组的行程已十分接近。各组间在不同时间点进行比较时发现,大鼠在第 1、3 组次时的平均搜索行程具有显著性差异,进一步两两比

较可见, 梗塞组与巴曲酶组大鼠在这两个组次相比差异具有显著性( $P < 0.05$ ), 巴曲酶与假手术组大鼠寻找站台所游的行程均较短, 二者没有显著性差别。

2.3 搜索策略的比较 见表 3。实验统计了不同组大鼠在第 1~8 组次所使用各种搜索策略的比例, 不同搜索策略在不同组内的百分比, 以及各组在不同组次时搜索策略的变化(如表 3 所示)。结果表明, 各组大鼠所使用的策略与处理有关, 巴曲酶组大鼠较多地使用了趋向式和直线式策略, 而梗塞组大鼠则以随机式策略为主。进一步分析发现, 巴曲酶组和假手术组在第 5~6 组次时趋向式和直线式策略已较多, 而梗塞组大鼠在第 7~8 组次时的搜索方式变化较为明显, 由随机式为主变为由趋向和直线式为主, 且具有显著性差异( $P < 0.001$ )。

表 3 各组大鼠在第 1~8 组次的搜索策略比较(%)

| 组别   | 随机式  | 边缘式 | 趋向式  | 直线式  |
|------|------|-----|------|------|
| 梗塞组  | 46.7 | 7.3 | 24.0 | 22.0 |
| 巴曲酶组 | 36.0 | 4.7 | 33.3 | 26.0 |
| 假手术组 | 30.7 | 2.7 | 36.0 | 30.7 |

与梗塞组比较,  $\chi^2 = 14.289, P < 0.05$

### 3 讨论

本研究结果表明, 巴曲酶可以显著地缩短梗塞大鼠在 Morris 迷宫中搜索目标的反应时和行程; 而且与梗塞组相比, 巴曲酶组大鼠较多地使用了正常的认知策略, 由随机式过渡到趋向和直线式策略的过程与假手术组亦无明显差别。巴曲酶组大鼠的反应时和搜索行程在第 1~3 组次时已较梗塞组明显缩短, 与假手术组没有差异, 表明在行为训练第 2 天巴曲酶已明显改善梗塞大鼠的空间认知功能障碍, 提示早期应用巴曲酶可以对脑缺血起到治疗作用。巴曲酶组大鼠的反应时和行程变化均较为平稳, 提示其作用时间长, 对梗塞大鼠的学习障碍具有持续的改善作用。大鼠应用各种搜索方式都可以使反应时和行程缩短, 因而考察其行为变化还需要考虑搜索策略这一指标<sup>[8-10]</sup>。大鼠在 Morris 迷宫中的搜索方式可以分为 4 种, 即随机式、边缘式、趋向式、直线式。随机式策略的轨迹出现于迷宫的大部分区域, 具有较大的盲目性; 边缘式则是根据局部距离线索确定目标, 是以自我为参照点的认知方式, 这种策略在正常大鼠的行为训练早期或某些脑区损毁大鼠中出现比例较高; 趋向式是图式策略形成过程中的一种过渡形式, 它有赖于大鼠对目标的位置及方向的判

断基本正确, 但定位尚不精确; 直线式即图认知, 是动物根据迷宫外线索逐渐形成的以异我为参照点的认知方式。在这种认知方式的形成中, 大鼠基本上都经过从随机式和边缘式到趋向、直线式的变化过程<sup>[8]</sup>, 搜索策略的变化较反应时和行程的变化晚, 但它一旦形成, 就相对稳定, 直线式即图认知方式的形成表明正确而有效的参考记忆形成<sup>[11]</sup>。巴曲酶组大鼠在第 5~6 组次时已较多地使用趋向式和直线式策略, 和梗塞组相比, 其变化快而稳定, 表明巴曲酶对于大鼠单侧颞叶梗塞后空间认知学习障碍的改善是显著的。

许多神经递质系统迄今为止被认为在空间认知活动中起重要作用, 如胆碱能(Ach)系统、谷氨酸(Glu)能系统、GABA 能系统和一些肽类<sup>[6,10]</sup>。研究证实颞叶皮层直接或间接参与了脑的空间认知加工过程。而颞叶皮层梗塞后大鼠海马 CA<sub>1</sub> 和 CA<sub>4</sub> 区有大量神经元脱失, 神经递质系统也发生紊乱, 推测巴曲酶改善大鼠空间学习的作用机理与它能改善神经介质代谢紊乱密切相关。病理组织学研究发现巴曲酶可以使海马 CA<sub>1</sub> 区缺血变化和细胞变性坏死减少, 神经细胞存活率增高<sup>[12]</sup>, 从形态学方面提供了巴曲酶改善神经元功能的佐证。文献报道, 巴曲酶可以抑制血栓形成, 减轻脑水肿, 清除自由基, 降低 NO 含量, 调节兴奋性氨基酸, 下调 c-fos 基因表达, 以及使 HSP70 表达增多等, 它可以通过这些机理在脑缺血的早期改善空间认知功能障碍。另外由于巴曲酶可以使 bFGF 样免疫反应增强, 而 bFGF 可以促进中枢神经系统内神经元、胶质细胞及内皮细胞生长, 阻滞大鼠海马内谷氨酸兴奋毒性, 增加胆碱能细胞的存活, 提高星状细胞中 NGF 浓度, 且在短暂性脑缺血后其免疫活性增强的持续时间比 NGF 长<sup>[13-15]</sup>。另一项研究证实 HSP70 是在脑缺血再灌注的 12 小时~6 天时表达增多, 而 bFGF 样免疫反应在 6 天达到高峰, 并持续至 3 周<sup>[4]</sup>。因而与 HSP70 和 NGF 相比, bFGF 可能是在脑缺血后期的神经保护机理<sup>[4,13-15]</sup>, 巴曲酶可以刺激神经营养因子如 bFGF 发挥持久的作用。

### 参考文献

- 匡培根, 陶沂, 田亚平, 等. 巴曲酶对大鼠缺血再灌注损伤的保护作用——降低 NO 神经毒性作用. 临床神经病学杂志, 1995, 8: 329
- 刘军, 匡培根, 张凤英, 等. 巴曲酶的神经保护作用——缺血再灌注后不同时程热休克蛋白 70 及病理组织学变化的相关性研究

中风与神经疾病杂志, 1996, 13: 137

3 匡培根, 张凤英, 李振洲, 等. 缺血性脑卒中与脑组织加压素相关性研究及巴曲酶的影响. 临床神经病学杂志, 1995, 8: 261

4 匡培根, 刘军, 吴卫平. 巴曲酶对局灶性脑缺血再灌注大鼠成纤维细胞生长因子样免疫反应的影响. 中风与神经疾病杂志, 1996, 13: 78

5 吴卫平, 姜树军, 匡培根, 等. 巴曲酶改善颞叶梗塞大鼠学习记忆能力的研究. 心理学报, 1997, 29: 70

6 McNamara RK, Skelton RW. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. Brain Res Rev, 1993, 18: 33

7 向敬, 匡培根. 选择性白鼠感觉运动区梗塞模型建立与缺血损伤定量分析技术. 中华医学杂志, 1994, 26: 417

8 隋南, 匡培梓. 隔区或皮质顶叶损毁对大鼠空间认知能力的影响及大鼠搜索策略差异的研究. 心理学报, 1992, 24: 80

9 隋南, 陈双双, 匡培梓. 海马结构、前额叶皮质或尾-壳核损毁对大鼠空间认知能力的影响. 心理学报, 1992, 24: 415

10 隋南, 谢东, 匡培梓. 杏仁复合体损毁对大鼠空间认知能力的影  
响. 心理学报, 1995, 27: 3111

11 Jackson JJ, Soliman MR. Effects of tacrine (THA) on spatial reference memory and cholinergic enzymes in specific rat brain regions. Life Sci, 1996, 58: 47

12 匡培根, 陶沂, 蒲传强. 东菱克栓酶对脑缺血再灌注损伤的保护作用的形态学证据. 中国新药杂志, 1996, 5: 219

13 Nakata N, Kato H, Kogure K. Protective effects of basic fibroblast growth factor against hippocampal neuronal damage following cerebral ischemia in the gerbil. Brain Res, 1993, 605: 354

14 Yoshida K, Gage FH. Cooperative regulation of nerve growth factor synthesis and secretion in fibroblasts and astrocytes by fibroblast growth factor and other cytokines. Brain Res, 1992, 569: 14

15 Grothe C, Otto D, Unsicker K. Basic fibroblast growth factor promotes in vitro survival and cholinergic development of rat septal neurons: comparison with the effects of nerve growth factor. Neurosci, 1989, 31: 649

(收稿 1998-11-16 修回 1999-03-11)

## 癫痫儿童可溶性白细胞介素-2 受体的研究

肖成华 沈 霞 张言超

为了进一步探讨癫痫免疫功能异常的机理, 我们采用生物学方法检测了癫痫患儿和正常儿童 sL-2R 的水平. 现将结果报道如下.

### 1 对象与方法

1.1 对象 癫痫组: 32 例, 男 20 例, 女 12 例, 年龄 3~15 岁, 平均 9.4±3.2 岁, 病程 3 月~5 年, 平均 1.7±1.2 年. 根据临床表现、脑电图及其它有关辅助检查确诊, 排除了其它免疫性疾病且未曾服用任何抗癫痫药物. 对照组: 30 例均系健康体检儿童, 其中男 19 人, 女 11 人, 年龄 3~14 岁, 平均 9.1±2.8 岁.

1.2 方法 用广州产植物血凝素 (PHA) 50 μg/ml 刺激外周血单个核细胞 (PBMC), 置 5% CO<sub>2</sub> 37 环境 48 小时, 离心后收取上清液, 于 -20 中保存待测. 采用双抗体夹心法测定 sL-2R, ELISA 试剂盒由白求恩医科大学免疫学教研室提供.

1.3 统计学处理 两样本均数间比较采用 *t* 检验.

2 结果 癫痫组血 sL-2R 水平较对照组明显升高 ( $P < 0.01$ ), 见表 1.

表 1 两组 sL-2R 检测结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

|     | 例数 | sL-2R (pmol/L) |
|-----|----|----------------|
| 癫痫组 | 32 | 126.4 ± 63.7*  |
| 对照组 | 30 | 40.7 ± 20.5    |

与对照组相比 \* $P < 0.01$

3 讨论 目前许多研究, 证实癫痫患者的确存在某些免疫异常, 包括细胞免疫、体液免疫及其它免疫功能的异常. Fontana 报道约有 20%~32% 的癫痫患者有选择性 IgA 降低, 阮旭中等 (中国神经精神疾病杂志, 1986) 发现原发性癫痫儿童的 IgG、IgM 显著下降, 继发性癫痫儿童的 IgM 亦下降. 在细胞免疫方面也有人证实癫痫患者 T 细胞亚群分布异常, 总 T 细胞、CD<sub>4</sub> 降低, CD<sub>8</sub> 增高, CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> 比值降低. 这说明癫痫患者的免疫功能处于抑制状态. 近年来 L-2 及其受体一直是免疫学研究的重要内容, L-2 是机体复杂免疫网络中起调节作用的重要淋巴因子, 活化的细胞在产生 L-2 的同时, 还表达 L-2R, 并与 L-2 产生应答. sL-2R 有两种, 即存在于白细胞表面的膜受体 (mL-2R) 和游离的

可溶性受体 (sL-2R). sL-2R 水平可间接反映机体的细胞免疫功能状态, sL-2R 增高与免疫功能低下及病情严重程度密切相关. Laurence 认为 sL-2R 是 L-2 介导的免疫反应调节拮抗蛋白, sL-2R 可与 mL-2R 竞争与 L-2 结合, 其作用类似封闭因子. sL-2R 亦能中和活化 T 淋巴细胞周围的 L-2, 减少机体的自分泌效应. 当机体出现高水平 sL-2R 时提示机体的细胞免疫功能低下 (Annals of Internal Medicine, 1990).

目前有关癫痫 mL-2R 变化有少量报道, 但测定血清中 sL-2R 的水平却甚少. 本研究检测 32 例癫痫患儿及 30 例正常儿童血清中 sL-2R, 结果显示癫痫患儿 sL-2R 水平明显高于正常对照组, 说明癫痫发作也有免疫细胞参与. 提示我们在治疗癫痫时应注意调节机体的免疫功能紊乱, sL-2R 还可作为临床病情估计和判断预后的一项免疫指标.

(收稿 1998-07-30 修回 1998-10-04)

作者单位: 221002 徐州医学院附属医院神经内科 (肖成华, 沈霞), 中心实验室 (张言超)