

# 巴曲酶对大鼠颞叶梗死后空间认知障碍的改善和 PDGF 表达的影响

姜树军 吴卫平 匡培根 匡培梓 杨炯炯 胡家芬

**【摘要】** 目的:探讨巴曲酶对单侧颞叶缺血性损害大鼠空间认知加工能力的改善作用及与 PDGF 表达的关系。方法:用 Morris 迷宫监测大鼠空间认知能力,行为。实验结束后取脑进行梗死体积测定及 PDGF 免疫组化分析。结果:(1)、巴曲酶可以显著地缩短梗死大鼠在 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。巴曲酶治疗组颞叶梗死体积较单纯梗死组显著缩小,PDGF-A 表达明显减少。结论:提示巴曲酶对单侧颞叶梗死大鼠空间认知功能障碍确有改善作用,其物质基础是巴曲酶减小了梗死体积,PDGF-A 表达与颞叶损害有关联。

**【关键词】** 巴曲酶 脑梗死 空间认知 Morris 迷宫 PDGF

**Effects of batroxobin on spatial learning of rats with left temporal infarction and expression of PDGF** Jiang Shujun, Wu Weiping, Kuang Peigen, et al. The Lab of Neurotransmitters, PLA General Hospital, Beijing 100853

**【Abstract】 Objective:** The effects of Batroxobin on spatial cognition with left temporal infarction of rats and the expression of PDGF-A were investigated. **Methods:** The spatial cognition ability of rats were monitored by Morris water maze. Then the rats brains were analysed by HE and PDGF immunohistochemistry. **Results:** Batroxobin reduced the reaction time and distance of this kind of spatial learning test. Moreover, the rats of Batroxobin groups used normal strategies more often, and the strategies changed more fast than that of the damage group. Batroxobin reduced the size of the infarction and down-regulated the expression of PDGF-A. **Conclusion:** Batroxobin can improve spatial learning ability of the temporal infarct rats, which at least based on reducing the infarction. The down-regulation of the expression of PDGF-A probably is related to the neuroprotective mechanism.

**【Key words】** Batroxobin cerebral infarction spatial cognition Morris water maze PDGF

虽然对巴曲酶(Batroxobin)的作用机理有许多报道<sup>[1-4]</sup>,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。我们以前的研究显示巴曲酶可以缩短颞叶梗死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>。本实验又应用 Morris 迷宫进一步探讨巴曲酶对单侧颞叶皮层缺血性大鼠空间认知加工过程的改善作用。近年来研究发现,中枢神经受到缺血损伤时血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)在缺血灶局部表达明显增多<sup>[6]</sup>,因此我们同时观察了巴曲酶对颞叶梗死局部 PDGF 表达的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 实验动物及分组:**成年雄性 Wistar 大白鼠(北京医科大学动物中心提供),实验起始体重 200

±20g,共 30 只,随机分为 3 组,梗死对照组(n=10)、巴曲酶组(n=10)、假手术组(n=10)。实验期间摄食饮水自由,全部行为训练都在 10:00am-5:00pm 之间完成。行为实验结束后,取脑进行梗死体积测定及 PDGF 免疫组化分析。

**1.2 动物模型的制备:**采用新型的立体定向光化学诱导脑梗死技术,即将大鼠麻醉后,固定在立体定位仪上,从尾静脉注射玫瑰红(RB, 20mg/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,造成局灶性颞叶梗死<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),梗死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。

**1.3 行为实验:**各组大鼠从术后第 4d 开始 Morris 水迷宫行为实验,连续 5d。实验分为两个阶段:预训练(1d)及训练(4d),大鼠共接受训练 24 次,每天

作者单位:100853 北京 中国人民解放军总医院神经介质实验室(姜树军 吴卫平 匡培根) 北京 中国科学院心理研究所(匡培梓 杨炯炯 胡家芬)

6次,每次间隔15min。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。图像自动监视系统自动追踪大鼠游泳轨迹,并记录各项实验数据。实验指标有:反应时(s);行程(cm);搜索策略。反应时、行程以3次训练成绩为1个组次取平均值,训练4d,共8个组次。实验数据采用SPSS软件包进行方差分析和 $\chi^2$ 检验。

1.4 大鼠颞叶梗死体积测定及免疫组化分析:行为实验结束后,麻醉、灌注、取脑固定、脱水,从视交叉开始行30 $\mu$ 厚连续冠状切片。切片分2组:一组行PDGF-A(中山公司)免疫组化染色,相邻一组行HE

染色。

2 实验结果

2.1 反应时的比较:如表1所示:梗死组、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组次时的平均反应时具有显著性差异。进一步两两比较可见,梗死组与假手术组、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(s)比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	1	2	3	4	5	6	7	8	F值
梗死组	44.50 $\pm$ 51.14	44.73 $\pm$ 65.24	22.60 $\pm$ 18.31	13.90 $\pm$ 17.01	13.27 $\pm$ 10.60	6.77 $\pm$ 4.02	9.13 $\pm$ 10.52	8.73 $\pm$ 9.43	7.5348 *
	15.73 $\pm$ 15.16	12.87 $\pm$ 7.47	9.20 $\pm$ 5.23	10.03 $\pm$ 5.96	9.70 $\pm$ 7.23	7.90 $\pm$ 5.58	8.33 $\pm$ 6.30	7.30 $\pm$ 4.09	
巴曲酶组	20.47 $\pm$ 16.55	18.50 $\pm$ 13.84	10.43 $\pm$ 9.45	11.80 $\pm$ 10.98	10.17 $\pm$ 6.62	6.80 $\pm$ 3.70	7.60 $\pm$ 6.64	7.80 $\pm$ 6.23	3.9412 *
	6.8649 *	5.7791 *	10.9206 *	0.7572	1.6228	0.6137	0.2720	0.3294	
F值									

注:平均反应时间比较 \*  $P < 0.05$  梗死组与巴曲酶组比较  $P < 0.05$  梗死组与假手术组比较  $P < 0.05$

2.2 行程的比较:如表2所示:梗死组、巴曲酶组和假手术组各组大鼠内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,梗死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: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

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

组别	1	2	3	4	5	6	7	8	F值
梗死组	663.00 $\pm$ 647.09	541.43 $\pm$ 698.82	458.93 $\pm$ 400.99	318.90 $\pm$ 347.85	256.43 $\pm$ 184.94	144.03 $\pm$ 79.71	190.07 $\pm$ 196.63	189.53 $\pm$ 216.53	6.5068 *
	298.07 $\pm$ 294.18	271.03 $\pm$ 163.27	215.60 $\pm$ 133.93	240.13 $\pm$ 139.98	180.73 $\pm$ 105.88	156.13 $\pm$ 105.53	154.30 $\pm$ 94.81	153.23 $\pm$ 77.89	
巴曲酶组	370.97 $\pm$ 417.20	383.20 $\pm$ 362.25	193.87 $\pm$ 134.19	239.20 $\pm$ 189.03	178.63 $\pm$ 123.36	135.43 $\pm$ 60.12	161.63 $\pm$ 142.83	159.73 $\pm$ 106.11	5.5163 *
	4.9328 *	2.5703	9.9099 *	1.0682	2.9164	0.4611	0.4721	0.5251	
F值									

注:1~8组组间比较 \*  $P < 0.05$  梗死组与巴曲酶组比较  $P < 0.05$

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

明显,由随机式为主,变为由趋向式和直线式为主,且具有显著性差异( $P < 0.05$ )。

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
梗死组	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

注: $\chi^2 = 14.289, P < 0.05$

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,而梗死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,而梗死组大鼠在第7-8组次时的搜索方式变化较为

2.4 梗死体积:每组取4只鼠脑,通过系列HE染色切片,计算梗死体积,发现梗死组和巴曲酶组左侧颞叶皮层存在梗死灶,梗死灶中心点位于视交叉后4.8  $\pm$  5.0mm。但巴曲酶治疗组梗死体积较单纯梗死组显著缩小( $F = 110, P < 0.01$ ),见表4。

表4 各组大鼠梗死体积比较( $\bar{x} \pm s$ )

	n	梗死体积(mm <sup>3</sup> )
梗死组	4	2.2834 $\pm$ 0.0535
巴曲酶组	4	0.1235 $\pm$ 0.0041
假手术组	4	0

注: $F = 421, P < 0.01$ ;与梗死组比较  $P < 0.01$

2.5 PDGF-A 免疫组化分析 PDGF 免疫组化检测发现,在梗死灶及周边脑组织 PDGF-A 表达,其中单纯梗死组 PDGF-A 表达最多(+++),巴曲酶治疗组居中(++),假手术组基本无 PDGF-A 表达,(图 1 见附页)。

### 3 讨论

我们所使用的光化学诱导脑梗死技术的核心机理是血液中的光化学物质玫瑰红遇到光线后,发生光化学反应,释放自由基损伤血管内皮,进而形成血栓,引起脑梗死<sup>[7]</sup>。从本实验巴曲酶能显著缩小光化学诱导的颞叶皮层梗死体积来推测,巴曲酶可能在此模型上通过抑制血栓形成,增加神经细胞保护物质表达等机制发挥其治疗作用。

研究结果表明,巴曲酶可以显著地缩短梗死大鼠在 Morris 迷宫中搜索目标的反应时和行程;而且与梗死组相比,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 组次时已较梗死组明显缩短,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死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,对梗死大鼠的学习障碍具有持续的改善作用。其物质基础是巴曲酶缩小了颞叶皮层梗死体积。

血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)由 A、B 两条肽链以不同方式组合而成。PDGF 是一种多向性、多功能性细胞因子,它能促进成纤维细胞、成骨细胞、平滑肌细胞和胶质细胞发生有丝分裂。它还能作用于血管内皮细胞和神经细胞,引起增殖、趋化、肌动蛋白重组和钙流动等一系列细胞反应<sup>[8]</sup>。许多细胞都能产生 PDGF。平滑肌细胞,激活的成纤维细胞,滋养层细胞,激活的单核/巨噬细胞,动脉内皮细胞,神经细胞,胶质细胞,以及肿瘤细胞均能表达 PDGF<sup>[6]</sup>。

当中枢神经系统发生创伤、卒中、脑膜炎、脑脓肿等病变时,则脑内 PDGF 表达水平增加。从卒中死亡患者脑中取样分析发现<sup>[6]</sup>,在 mRNA 水平,PDGF-A 和 PDGF-B 主要在梗死灶周围的缺血半暗

带中的神经元中表达。在蛋白水平,PDGF-AB 和 PDGF-BB 免疫反应物在绝大多数细胞类型中表达。在缺血脑组织中 PDGF 表达水平升高的意义不完全明了,但至少它与梗死灶内血管再生和胶质增生有关,另外它也可能与神经轴索再生有关。本实验假手术组无 PDGF-A 表达,而单纯梗死组大鼠梗死灶及附近 PDGF-A 表达显著增多,这与国外研究结果相一致。巴曲酶组 PDGF-A 表达与梗死组相比显著减少,可能是因为经巴曲酶治疗,颞叶缺血减轻,颞叶所受应激损害相对减少所致。

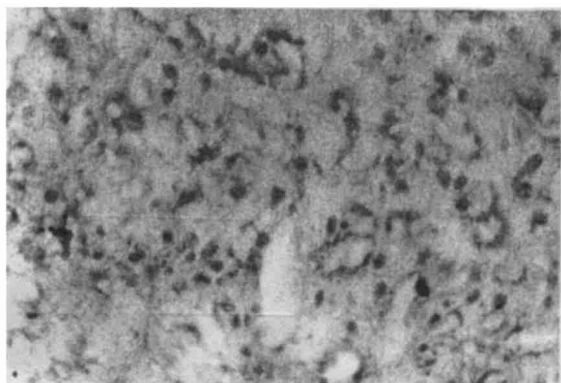
病理组织学研究发现巴曲酶可以使海马 CA1 区缺血变化和细胞变性坏死减少,神经细胞存活率增高<sup>[9]</sup>,从形态学方面提供了巴曲酶改善神经元功能的佐证。文献报道,巴曲酶可以抑制血栓形成,减轻脑水肿,清除自由基,降低 NO 含量,调节兴奋性氨基酸,下调 c-fos 基因表达,以及使 HSP70 表达增多等,它可以通过这些机制在脑缺血的早期改善空间认知功能障碍。

### 参考文献

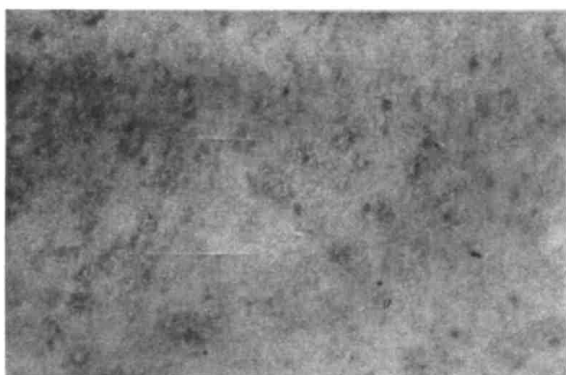
- 匡培根,陶沂,田亚平,等.巴曲酶对大鼠缺血再灌注损伤的保护作用-降低 NO 神经毒性作用.临床神经病学杂志,1995,8:329
- 刘军,匡培根,张凤英,等.巴曲酶的神经保护作用-缺血再灌注后不同时程热休克蛋白 70 及病理组织学变化的相关性研究.中风与神经疾病杂志,1996,13(3):137
- 匡培根,张凤英,李振洲,等.缺血性脑卒中与脑组织加压素相关性研究及巴曲酶的影响.临床神经病学杂志,1995,8:261
- 匡培根,刘军,吴卫平.巴曲酶对局灶性脑缺血再灌注大鼠成纤维细胞生长因子样免疫反应的影响.中风与神经疾病杂志,1996,13:78
- 吴卫平,姜树军,匡培根,等.巴曲酶改善颞叶梗塞大鼠学习记忆能力的研究.心理学报,1997,29(suppl):70
- Krupinski J, Issa R, Bujny T, et al. A putative role for platelet-derived growth factor in angiogenesis and neuroprotection after ischemic stroke in humans. Stroke, 1997, 28:564
- 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
- Silberstein FC, Simone R, Levi G, et al. Cytokine-regulated expression of platelet-derived growth factor gene and protein in cultured human astrocytes. J Neurochem, 1996, 66:1409
- 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

(1998-12-07 收稿 1999-02-08 修回)

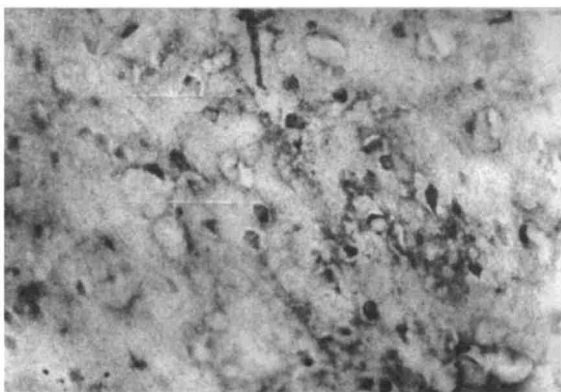
巴曲酶对大鼠颞叶梗死后空间认知障碍的改善和 PDGF 表达的影响 (正文见 76 页)



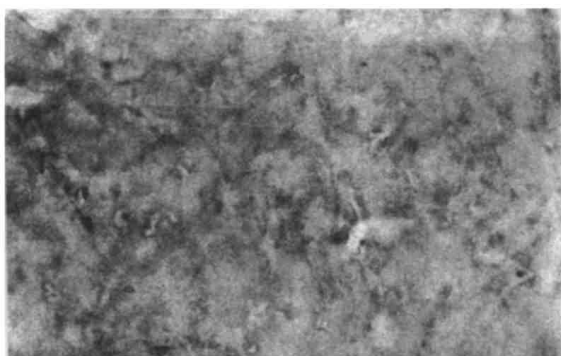
梗死组左侧颞叶



梗死组右侧颞叶



巴曲酶组左侧颞叶



假手术组左侧颞叶

图 1 颞叶皮层 PDGF-A 免疫反应阳性细胞比较 (20 × 10)

婴儿期维生素 K 缺乏症颅内出血的 CT 分析 (正文见 94 页)

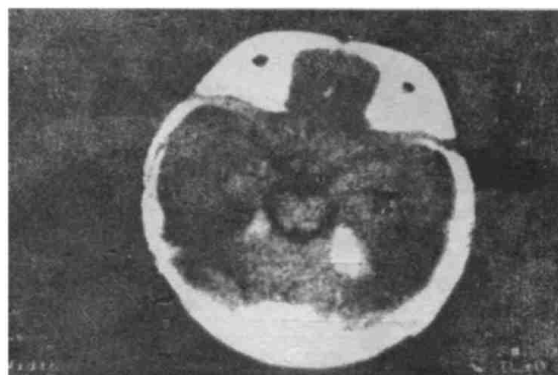


图 1 蛛网膜下腔出血并脑水肿:小脑幕、纵裂池高密度铸型,两侧对称大面积低密度水肿



图 2 跨纵裂硬膜下出血、蛛网膜下腔出血并脑水肿:后纵裂池、枕部新月形高密度影、上矢状窦呈相对低密度,大小形态正常,两侧大脑半球对称性脑水肿



图 3 慢性硬膜下血肿:右枕梭形低密度,有明显占位效应,上矢状窦正常



图 4 硬膜下出血、脑出血并脑水肿:左额颞枕新月形混杂密度影,脑实质内大片脑水肿中有高密度出血影,上矢状窦受压变形向右移位



图 5 硬膜下出血、蛛网膜下腔出血并脑水肿,压迫上矢状窦



图 6 两侧硬膜下出血、脑萎缩

235 例颅内转移性肿瘤的临床病理与预后 (正文见 104 页)

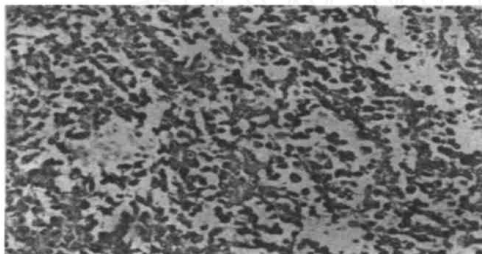


图 1 HLC3-AB 标记脑转移性肺癌,腺上皮细胞浆内呈阳性,间质呈阴性(确标染色, ×200)

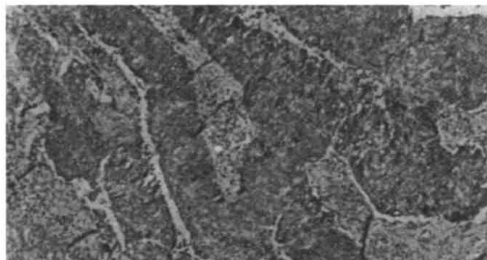


图 2 Keratin 标记脑转移性肺癌,鳞状上皮呈阳性,间质呈阴性(PAP 法染色, ×200)

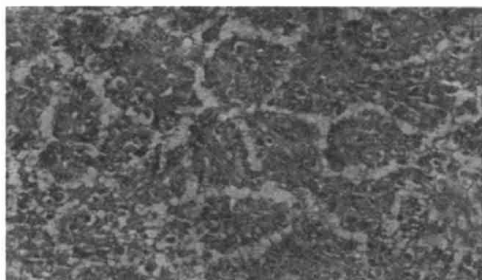


图 3 颅内转移性甲状腺乳头状腺癌,上皮细胞呈阳性,间质呈阴性(HE 染色, ×200)

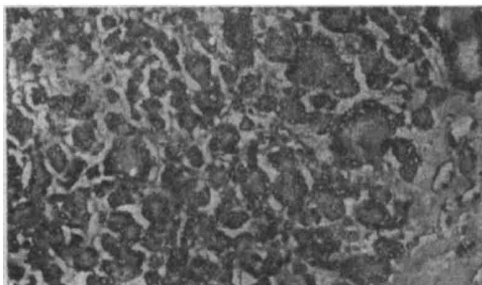


图 4 颅内转移性甲状腺滤泡性腺癌,上皮细胞呈阳性,间质呈阴性(HE 染色, ×200)

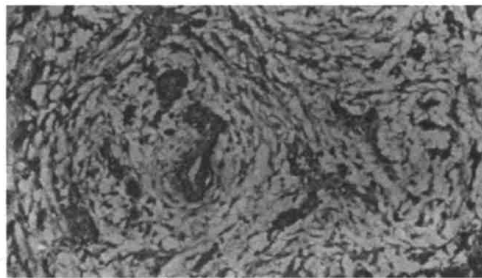


图 5 PR 标记颅内转移性乳腺癌,癌上皮细胞呈阳性,间质呈阴性( ×200)

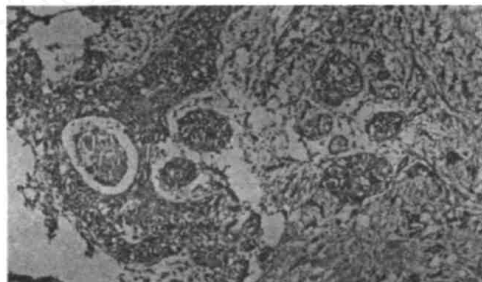


图 6 ER 标记颅内转移性乳腺癌,癌上皮细胞呈阳性,间质呈阴性( ×200)

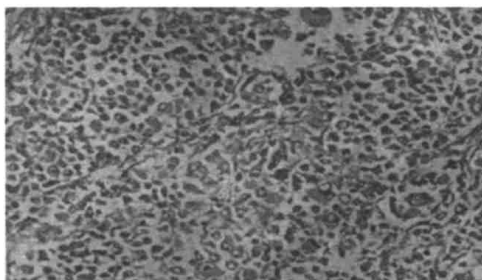


图 7 EMA 标记颅内转移性胃腺癌,腺上皮细胞呈阴性,间质呈阴性( ×200)

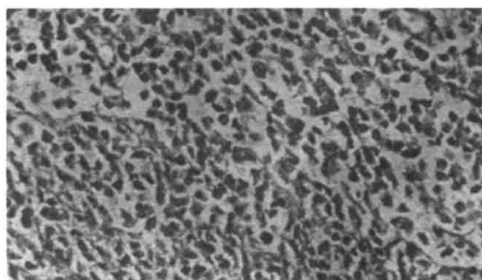


图 8 CLA 标记颅内转移性恶性淋巴瘤,瘤细胞呈阳性,间质呈阴性( ×200)