

槲皮素对缺氧缺血性脑白质损伤 新生大鼠学习记忆能力的影响

黄晶晶¹ 刘轩² 王兴启² 杨丽华² 戚大石² 姚瑞芹²

(1. 江苏师范大学生命科学学院, 江苏 徐州 221116; 2. 徐州医学院神经生物学教研室, 江苏 徐州 221002)

[摘要] **目的** 研究槲皮素(QUE, 黄酮类化合物)对缺氧缺血性脑白质损伤新生大鼠学习记忆能力的影响。**方法** 生后3 d Sprague-Dawley(SD)大鼠60只, 随机分成对照组、模型组和 QUE 处理组(20 mg/kg 和 40 mg/kg), 每组15只。模型组和 QUE 处理组行右侧颈总动脉结扎及缺氧处理以建立缺血缺氧性脑白质损伤模型。QUE 处理组每日给药一次, 连续6周。第6周时分别用 Morris 水迷宫及开场试验评价其学习记忆能力和行为情感。**结果** 从训练的第2天开始, 模型组逃避潜伏时间(EL)明显长于对照组($P < 0.01$), 20 和 40 mg/kg QUE 处理组 EL 明显短于模型组($P < 0.05$)。模型组大鼠穿越原平台次数明显低于对照组($P < 0.01$)及两个 QUE 组($P < 0.05$)。开场试验显示, 模型组大鼠后肢站立次数较对照组增加, 中央区域驻留时间较对照组延长, QUE 处理后大鼠后肢站立次数较模型组明显减少($P < 0.05$), 中央区域驻留时间明显缩短($P < 0.05$)。**结论** QUE 可以明显改善缺血缺氧性脑白质损伤新生大鼠的学习记忆及行为情感障碍, 对中枢神经系统脑白质损伤具有保护作用。

[中国当代儿科杂志, 2012, 14(6):454-457]

[关键词] 槲皮素; 缺血缺氧; 脑白质损伤; Morris 水迷宫; 开场试验; 新生大鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)06-0454-04

Effects of quercetin on the learning and memory ability of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage

HUANG Jing-Jing, LIU Xuan, WANG Xing-Qi, YANG Li-Hua, QI Da-Shi, YAO Rui-Qin. College of Life Science, Jiangsu Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China (Yao R-Q, Email: wenxi_yao@163.com)

Abstract Objective: To study the effects of quercetin, a flavonoid, on the learning and memory ability of 3-day-old neonatal rats with hypoxic-ischemic brain white matter damage (WMD). **Methods** Sixty 3-day-old Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups: control, WMD model, and quercetin treatment groups (20 and 40 mg/kg). There were 15 rats in each group. Rats in the WMD model and the two quercetin treatment groups were subjected to right common carotid artery ligation followed by 2 hrs of exposure to 8% O₂ to induce periventricular white matter injury. After the operation quercetin was administered daily in the two quercetin treatment groups for 6 weeks. Six weeks later, Morris water maze and open-field tests were carried out to test memory and learning ability as well as behavior and cognition. **Results** From the second day of training, escape latency in the Morris water maze test was more prolonged in the WMD model group than in the control group ($P < 0.01$). The escape latency in the two quercetin treatment groups was shortened significantly compared with the WMD model group ($P < 0.05$). The WMD model group crossed the original platform fewer times compared with the control and quercetin treatment groups ($P < 0.05$). The open-field test indicated that the number of rearings increased and time spent in the centre was extended in the WMD model group compared with the control group. Compared with the WMD model group, the number of rearings was significantly reduced ($P < 0.05$) and time spent in the centre was significantly shortened in the quercetin treatment groups ($P < 0.05$). **Conclusions** Quercetin treatment can improve memory and learning ability as well as cognitive ability in neonates with WMD, suggesting that quercetin protects against WMD resulting from hypoxia-ischemia. [Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(6):454-457]

Key words: Quercetin; Hypoxia-ischemia; White matter damage; Morris water maze; Open-field test; Neonatal rats

小儿脑瘫是较常见的运动功能伤残疾病, 流行病学调查显示脑瘫患病率为 0.2% ~ 0.3%, 每年新

[收稿日期] 2011-11-09; [修回日期] 2012-03-01
[基金项目] 国家自然科学基金(30801526); 江苏省高校自然科学基金(09KJD310010); 徐州医学院院长专项基金(09KJZ14)。
[作者简介] 黄晶晶, 女, 硕士。
[通信作者] 姚瑞芹, 副教授。

增脑瘫患儿4.6万^[1],给患儿家庭和社会都带来极大的痛苦和负担,目前对该病尚无有效的治疗措施,其主要病理改变为少突胶质细胞缺血缺氧损伤和髓鞘形成障碍而引起的脑室周围白质损伤^[2]。

槲皮素(querletin, QUE),化学名为3, 3', 4', 5, 7-五羟基黄酮,是自然界含量最丰富的黄酮类化合物之一,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤和抗病毒等作用^[3-5]。此外,QUE还能通过抗氧化作用增强衰老小鼠的学习记忆能力^[6],发挥神经保护的作用。本课题组前期研究发现,QUE对少突胶质前体细胞(oligodendrocyte precursor cells, OPCs)缺氧低糖损伤有明显的神经保护作用^[7-8]。但QUE是否对缺血缺氧性脑白质损伤新生大鼠起保护作用并改善神经功能,尚未有报道。本研究主要观察QUE对缺血缺氧性脑白质损伤3日龄新生大鼠学习记忆及行为情感的影响,以期为进一步研究QUE的神经保护作用提供行为学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

60只健康3日龄Sprague-Dawley(SD)大鼠由徐州医学院动物中心提供,随机分为对照组、模型组和QUE处理组(20 mg/kg和40 mg/kg),每组15只。

1.2 缺血缺氧性脑白质损伤模型制作

参照文献^[9],大鼠经乙醚吸入后麻醉,仰卧位,四肢及头部固定。碘伏消毒颈部皮肤,取颈部正中切口,分离右侧颈总动脉,双结扎后缝合皮肤。返回原笼中休息2 h后,放入密闭容器中,以2 L/min的速度输入8% O₂和92% N₂的混合气体,持续2 h,取出后返回原笼饲养。整个缺氧过程环境温度控制在35℃左右。对照组仅游离右侧颈总动脉,未进行结扎及缺氧处理。两个不同剂量的QUE处理组缺氧后2 h开始分别灌胃给予QUE 20 mg/kg、40 mg/kg,每日给药一次,连续6周。对照组全部存活,其余3组大鼠术后6周内共死亡12只(模型组死亡7只,20 mg/kg QUE处理组死亡2只,40 mg/kg QUE处理组死亡3只),死亡率为27%。每组选取存活大鼠8只,进行水迷宫及开场试验。

1.3 Morris水迷宫试验

大鼠造模后6周进行Morris水迷宫(淮北正华生物仪器设备有限公司)试验,测试其学习记忆能力。每组随机选取6周龄大鼠8只,每只大鼠连续训练4 d。每天将大鼠面向池壁分别从不同的入水

点放入,每次试验以120 s为限。若大鼠找到平台则系统自动停止记录并让大鼠在平台上休息15 s;若大鼠在120 s内没有找到平台,系统会停止记录并提示操作者将大鼠放在平台上15 s,每天训练2次,两次间隔4~5 h。试验期间,迷宫周围的参照物包括灯光及周围的器物等保持不变。4 d训练结束后移去水下平台,第5天时任意选一个入水点,将大鼠面向池壁放入水中,计入其在120 s内的游泳轨迹及穿越原平台位置的次数,考察大鼠对原平台的空间记忆能力。计算机自动跟踪计时并同步记录大鼠的游泳轨迹,Morris水迷宫数据采集分析软件记录相关数据及图像结果。

1.4 开场试验

Morris水迷宫试验完毕后,将大鼠放入开场试验箱中检测各组大鼠行为情感。先将大鼠放入箱底正中适应1 min,然后再放入方盒正中,观察5 min内大鼠行为,计算机自动跟踪记录。

1.5 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件对数据进行统计分析,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 学习记忆能力评价

2.1.1 定位航行试验 连续4 d的训练中,各组大鼠的逃避潜伏时间(escape latency, EL)均逐渐缩短。对照组大鼠EL明显缩短(图1A)。模型组大鼠EL相比对照组延长(图1B)。QUE处理组相比模型组EL明显降低(图1C和D)。统计结果显示:在第1天的训练中,4组大鼠EL差异无统计学意义。第2天,各组大鼠EL均缩短,对照组EL最短,模型组明显长于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),20和40 mg/kg QUE处理组EL明显短于模型组,差异有统计学意义(分别 $P < 0.01$, $P < 0.05$);40 mg/kg QUE处理组EL长于对照组($P < 0.05$),20 mg/kg QUE处理组与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。随着训练天数的增加,各组大鼠EL均进一步缩短。第4天时,对照组EL为 11.8 ± 2.2 s,模型组EL为 63.0 ± 14.6 s,20和40 mg/kg QUE处理组EL时间分别为 27.0 ± 5.3 s和 27.6 ± 2.2 s;模型组与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$),QUE处理组与模型组相比差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。20和40 mg/kg QUE处理组与对照组相比差异均无统计

学意义 ($P > 0.05$), 20 mg/kg QUE 组与 40 mg/kg QUE 组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2。

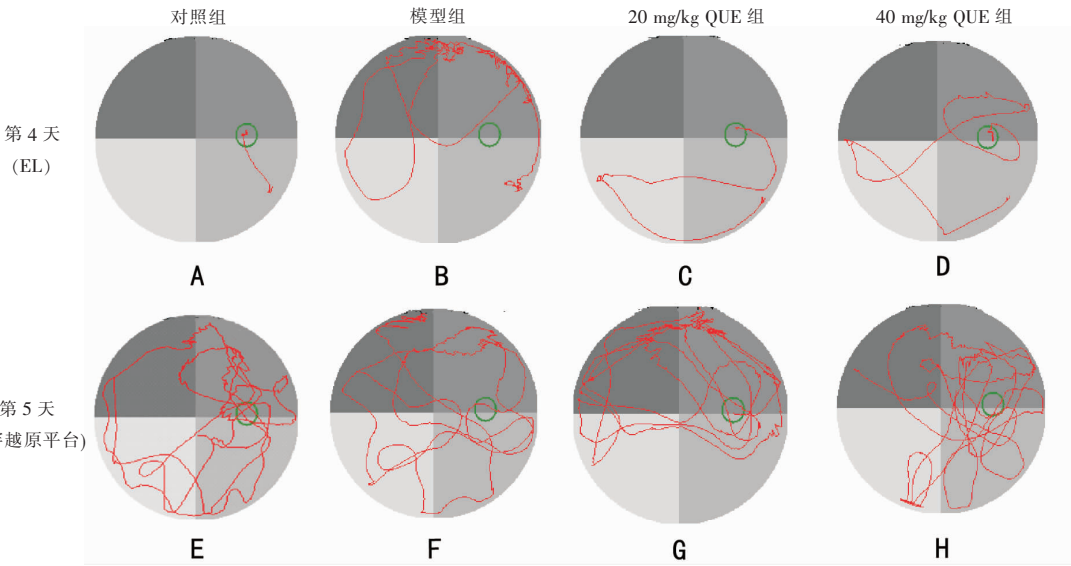


图 1 各组大鼠在 Morris 水迷宫中的典型游泳轨迹图 水迷宫分为四个象限,绿色圈代表平台放置位置,红色线代表大鼠游泳轨迹。第 4 天模型组大鼠逃避潜伏时间(EL)较对照组明显延长;QUE 处理组较模型组明显缩短。模型组穿越原平台次数较对照组少;与模型组比较,QUE 处理组穿越原平台次数明显增加。

2.1.2 空间探索试验 定位航行试验结束后第 2 天撤去隐藏在水下的平台,计数大鼠在 120 s 内穿越原平台的次数。对照组大鼠主要在原平台所在象限内游动,穿越原平台次数较多(图 1E);而模型组在各个象限内游动,穿越原平台次数少(图 1F);给予 QUE(20 mg/kg 和 40 mg/kg) 治疗明显增加了大鼠穿越原平台的次数(图 1G、H)。模型组大鼠在 120 s 内穿越原平台次数明显低于对照组 ($P < 0.01$),同时低于 20 mg/kg QUE 组 ($P < 0.01$) 及 40 mg/kg QUE 组 ($P < 0.05$)。20 和 40 mg/kg QUE 处理组与对照组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),20 mg/kg QUE 组与 40 mg/kg QUE 组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。

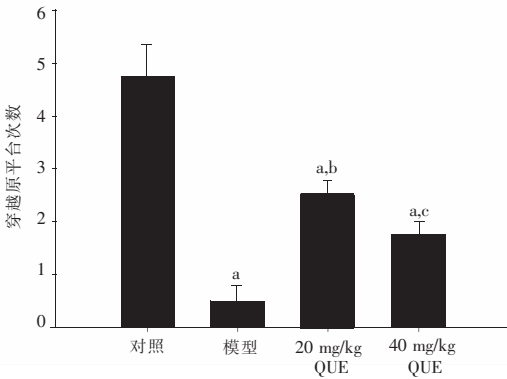


图 3 大鼠穿越原平台次数 ($n = 8$) a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与模型组相比, $P < 0.01$; c: 与模型组相比, $P < 0.05$ 。

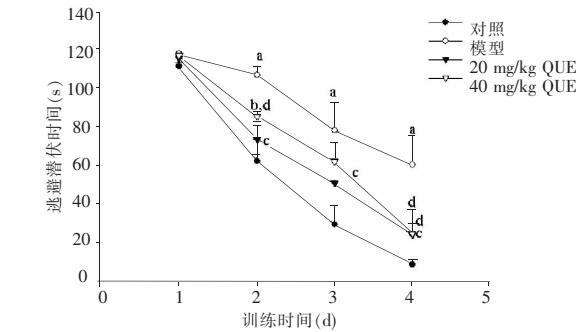


图 2 大鼠的逃避潜伏时间 ($n = 8$) a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与对照组比较, $P < 0.05$; c: 与模型组比较, $P < 0.01$; d: 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 行为情感评价

2.2.1 站立次数 将大鼠放入开场试验箱内, 5 min 内模型组站立次数明显多于对照组, 两个 QUE 处理组较模型组显著减少, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 两个 QUE 处理组与对照组比较, 差异无统计学意义。见表 1。

2.2.2 中央区域驻留时间 开场试验检测 5 min 内, 模型组大鼠在中央区域驻留时间明显高于对照组, 两个 QUE 处理组较模型组显著减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 两个 QUE 处理组与对照组比较, 差异无统计学意义。见表 1。

表1 大鼠站立次数及中央区域驻留时间 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	站立次数	驻留平均时间(min)
对照组	8	12.5 ± 3.0	1.5 ± 0.3
模型组	8	25.3 ± 2.6 ^a	10.8 ± 1.5 ^a
20 mg/kg QUE	8	14.5 ± 2.5 ^b	2.3 ± 0.7 ^b
40 mg/kg QUE	8	15.3 ± 2.6 ^b	2.5 ± 0.6 ^b

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$

3 讨论

早产儿缺血缺氧损伤是以选择性的白质损伤和髓鞘形成障碍为主要特征^[2]。OPCs 是围产期缺血缺氧(HI)损伤的靶细胞,是髓鞘形成细胞的前体细胞。HI 导致 OPCs 死亡,中断其发育成成熟的少突胶质细胞(oligodendrocyte, OL),从而影响髓鞘形成。Back 等^[10]证实人类脑白质易损期是孕 24 ~ 32 周,相当于大鼠日龄 2 ~ 4 d,此时脑白质中 OPCs 含量最丰富,对 HI 最敏感。

Morris 水迷宫是一个评价与海马认知功能有关的空间学习记忆的研究工具,也被用来评估与空间认知功能相关的其他脑区。本研究显示模型组在 Morris 水迷宫定向航行中 EL 延长,撤去平台后穿越原平台次数少,证明本实验模型造成大鼠的学习记忆障碍。开场试验中,模型组后肢站立次数和中央驻留时间明显增加,表明模型组大鼠行为情感出现了障碍。

近年来研究表明 QUE 具有神经保护作用。QUE 能保护大鼠因缺血而致的空间记忆减退和神经细胞死亡^[11],还能提高衰老小鼠的空间记忆能力^[6]。本研究进一步观察了 QUE 对脑白质损伤大鼠的学习记忆及情感的影响,发现 Morris 水迷宫定向航行中,QUE 治疗组相比模型组明显缩短了 EL,撤去平台后 QUE 治疗明显增加了大鼠穿越原平台的次数,提高了大鼠的空间记忆能力。在开场试验中,模型组大鼠表现焦躁忧虑,给予 QUE 治疗后有所改善。20 mg/kg QUE 组和 40 mg/kg QUE 组对脑白质损伤大鼠的学习记忆及情感均具有保护作用,两组相比差异无统计学意义。

研究报道 QUE 能改善乙醇、D-半乳糖等化合物所诱导的认知功能紊乱^[12-13],通过抑制钠离子通道改善慢性缺血大鼠的学习记忆能力^[14]。此外,QUE 通过抑制脂质过氧化反应、PARP 活性、caspase-3 活性、p53 表达以及增加内源性抗氧化物酶对大脑中动脉闭塞(MCAO)大鼠起到神经保护作用^[15]。本研究证实 QUE 对新生大鼠缺血缺氧性脑白质损伤具有神经保护作用,能有效地改善缺血缺氧新生大

鼠的学习记忆能力和行为情感,为临床上治疗脑瘫提供了行为学方面的依据。

[参考文献]

[1]

Sundrum R, Logan S, Wallace A, Spencer N. Cerebral palsy and socioeconomic status: a retrospective cohort study [J]. Arch Dis Child, 2005; 90(1): 15-18.

[2]

Cai Z, Pang Y, Xiao F, Rhodes PG. Chronic ischemia preferentially causes white matter injury in the neonatal rat brain [J]. Brain Res, 2001; 898(1): 126-135.

[3]

Kamaraj S, Vinodhkumar R, Anandakumar P, Jagan S, Ramakrishnan G, Devaki T. The effects of quercetin on antioxidant status and tumor markers in the lung and serum of mice treated with benzo(a) pyrene [J]. Biol Pharm Bull, 2007; 30(12): 2268-2273.

[4]

Kumar A, Sehgal N, Kumar P, Padi SS, Naidu PS. Protective effect of quercetin against ICV colchicine-induced cognitive dysfunctions and oxidative damage in rats [J]. Phytother Res, 2008; 22(12): 1563-1569.

[5]

Ozçelik B, Kartal M, Orhan I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids [J]. Pharm Biol, 2011; 49(4): 396-402.

[6]

程超,陆军,郑元林,刘文. 槲皮素对衰老小鼠学习记忆行为的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2004, 24(11): 1057-1059.

[7]

王兴启,刘轩,杨丽华,于红丽,翟玥,刘静,等. 槲皮素保护少突胶质前体细胞缺氧低糖损伤的体外研究 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(3): 338-341.

[8]

Wang XQ, Yao RQ, Liu X, Huang JJ, Qi DS, Yang LH. Quercetin protects oligodendrocyte precursor cells from oxygen/glucose deprivation injury in vitro via the activation of the PI3K/Akt signaling pathway [J]. Brain Res Bull, 2011; 86(3-4): 277-284.

[9]

曾田,杨丽华,黄晶晶,戚大石,王兴启,刘轩,等. 缺血缺氧性脑损伤对新生 3 日龄幼鼠学习记忆及情感行为的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(23): 3530-3538.

[10]

Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Levine JM, Volpe JJ, Kinney HC. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury [J]. J Neurosci, 2001; 21(4): 1302-1312.

[11]

Pu F, Mishima K, Irie K, Motohashi K, Tanaka Y, Orito K, et al. Neuroprotective effects of quercetin and rutin on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats [J]. J Pharmacol Sci, 2007; 104(4): 329-334.

[12]

Liu J, Yu H, Ning X. Effect of quercetin on chronic enhancement of spatial learning and memory of mice [J]. Sci China C Life Sci, 2006; 49(6): 583-590.

[13]

Lu J, Zheng YL, Luo L, Wu DM, Sun DX, Feng YJ. Quercetin reverses D-galactose induced neurotoxicity in mouse brain [J]. Behav Brain Res, 2006; 171(2): 251-260.

[14]

Yao Y, Han DD, Zhang T, Yang Z. Quercetin improves cognitive deficits in rats with chronic cerebral ischemia and inhibits voltage-dependent sodium channels in hippocampal CA1 pyramidal neurons [J]. Phytother Res, 2010; 24(1): 136-140.

[15]

Ahmad A, Khan MM, Hoda MN, Raza SS, Khan MB, Javed H, et al. Quercetin protects against oxidative stress associated damages in a rat model of transient focal cerebral ischemia and reperfusion [J]. Neurochem Res, 2011; 36(8): 1360-1371.

(本文编辑:王庆红)