

小分子抗自由基化合物对大鼠脑损伤保护作用研究

郭金兰 张澄波

[摘要] 目的 观察小分子抗自由基化合物对大鼠脑缺血、缺氧损伤的保护作用,为临床应用提供依据。方法 采用结扎大鼠颈动脉及进入低氧仓的方法建立脑缺血、缺氧损伤模型;腹腔注射小分子抗自由基化合物,观察大鼠脑组织海马区域细胞形态变化及血清中超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)的变化情况。结果 与模型对照组相比,实验组大鼠脑组织海马 CA1 区锥体细胞排列整齐紧密,形态基本正常,仅偶见细胞退行性改变;血清 SOD 酶活力升高,MDA 含量降低($P < 0.05$)。结论 小分子抗自由基化合物能提高大鼠血清中 SOD 酶活力,清除自由基,抑制脂质过氧化,保护脑细胞免受缺血、缺氧损害。

[关键词] 自由基;脑损伤;超氧化物歧化酶;丙二醛

Protective effects of the compound with low molecular weight of anti-free radical on brain injury in rats GUO Jin-lan, ZHANG Cheng-bo. Chinese Rehabilitation Medicine Research Institute, Beijing 100068, China

[Abstract] Objective To study the protective effects of the compound with low molecular weight of anti-free radical on brain ischemic and hypoxic injuries in rats. Methods The model of brain ischemic and hypoxic injuries in rats was established by unilateral carotid artery ligation just for 2 h. The compound was injected 30 minutes after the rats act on hypoxic state (10% O₂ + 90% N₂) for 1 h. Then the serum of rats was separated and the value of the superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) were determined, and the pathological changes were observed in brain tissue. Results Compared with rats in the model group, the compound decreased the concentrations of MDA in serum ($P < 0.05$), and raised the level of SOD ($P < 0.05$) significantly in therapy group. Otherwise, the pyramidal cells remained organized order, with only a few cells degenerated occasionally in rats of therapy group. Conclusion The compound has SOD-like activity. It can scavenge the free radical and inhibit peroxidation of lipid, so it can prevent brain cells from the damage.

[Key words] radical; brain injury; superoxide dismutase (SOD); malondialdehyde

中图分类号:R743 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2004)07-0406-02

[本文著录格式] 郭金兰,张澄波.小分子抗自由基化合物对大鼠脑损伤保护作用研究[J].中国康复理论与实践,2004,10(7):406-407.

脑缺血、缺氧是一种常见的病理过程^[1-3],继发于多种脑部疾病和颈部大型手术等。脑缺血后引起自由基产生增多,大量消耗抗氧化剂,使机体内防御系统活性降低,引起自由基损伤。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是机体内主要的自由基清除剂,但由于是大分子物质^[4],在体外使用或服用后不能迅速通过细胞膜及血脑屏障有效发挥清除自由基的作用,因而临床应用有一定局限性。本室参照国外文献^[9]合成了一种具有 SOD 活性的小分子抗自由基化合物^[5],本研究探讨该化合物对大鼠脑缺血性损伤的保护作用,旨在为其临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物及分组^[6] 健康 Wistar 雌性大鼠 36 只(首都医科大学实验动物中心提供),体重 140—160 g,随机分为假手术组、模型对照组和实验组(即小分子抗自由基化合物组),每组各 12 只。

1.2 大鼠脑缺血、缺氧损伤模型 以 1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉大鼠。假手术组大鼠行颈右侧切开,然后缝合伤口。模型对照组、实验组大鼠行颈右侧切开,分离颈总动脉,然后结扎,缝合伤口,放置笼中,恢复 2 h(基本苏醒)。模型对照组恢复 2 h 后放入低氧仓 2 h(仓内通入 10% O₂ + 90% N₂ 混合性气体);实验组手术 1.5 h 后腹腔注射 3 mg/ml 小分子抗自由基化合物(本室合成)2 ml,0.5 h 后放入低氧仓 2 h。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 大鼠血清中丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量及 SOD 活性测定 将假手术组及 2 h 后出仓的模型对照组、实验组大鼠用 1%戊巴比妥钠麻醉后开胸,心脏取血,室温放置 30 min,冰箱内放置 30 min,4000 r/min 离心分离血清,分别用 MDA 及 SOD 测试试剂盒(南京生物工程研究所生产)测定。

1.3.2 大鼠脑组织海马区域细胞形态变化观察 随机取实验后假手术组、模型对照组和实验组大鼠每组 2 只,取出脑组织,用 4%中性多聚甲醛固定,常规石蜡包埋、切片、HE 染色,光学显微镜下观察海马区域细胞形态变化。

1.4 统计学处理 数据以($\bar{x} \pm s$)表示,进行 t 检验。

作者单位:1.100068 北京市,中国康复医学研究所(郭金兰);2.100054 北京市,首都医科大学生化教研室(张澄波)。作者简介:郭金兰(1964-),女,甘肃兰州市人,硕士,主管技师,主要研究方向:脑损伤。

2 结果

2.1 与假手术组比较,模型对照组大鼠血清 MDA 含量明显升高($P < 0.01$),SOD 活力下降($P < 0.05$);与模型对照组比较,实验组大鼠血清 MDA 含量降低($P < 0.05$),SOD 活力升高($P < 0.05$)(见表 1)。

2.2 光镜观察显示,假手术组大鼠海马 CA1 锥体细胞

排列整齐密集,层次多,核大,染色浅,细胞质丰富;模型对照组大鼠海马 CA1 区锥体细胞排列整齐稀疏,可见细胞变性、水肿、染色深等变化;实验组大鼠海马 CA1 锥体细胞排列整齐紧密,形态基本正常,仅偶见细胞退行性改变(见图 1—图 3)。



图 1 伪手术组

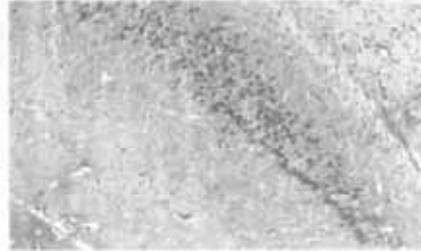


图 2 模型组



图 3 治疗组

表 1 大鼠血清中 MDA 和 SOD 变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MDA 含量	SOD 含量
假手术组	12	1.52 ± 0.73	145.63 ± 17.02
模型对照组	12	5.49 ± 2.83 ^a	127.73 ± 11.84 ^a
实验组	12	1.84 ± 0.50 ^b	147.94 ± 21.49 ^c

注:a:与假手术组比较, $P < 0.01$;与模型对照组比较,b: $P < 0.05$,c: $P < 0.01$ 。

3 讨论 在正常生理状态下,机体内存在着自由基代谢酶类和抗氧化剂等防御系统,因此机体内的自由基不易引起机体损伤^[8]。但脑缺血后自由基产生增多,大量消耗抗氧化剂,使防御系统活性降低,引起自由基对机体的损伤。脑缺血时,脑组织中兴奋性氨基酸含量增加并作用于 N-甲基-D-门冬氨酸(NMDA)受体,打开钙通道,使胞外钙流入胞内的量增加。同时,因氧供减少,ATP 分解,细胞内钙难以泵出胞外,导致钙超载。胞内 Ca^{2+} 增加的后果是:①三羧酸循环障碍, O_2 发生自还原生成 $O_2^{\cdot-}$; ② Ca^{2+} 激活蛋白激酶,引起黄嘌呤氧化酶和次黄嘌呤大量堆积,在黄嘌呤氧化酶催化次黄嘌呤转变为黄嘌呤并进而催化黄嘌呤转变为尿酸的反应中,产生大量的超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)和过氧化氢(H_2O_2),后者又在金属离子参与下形成羟自由基($\cdot OH$)。中枢神经系内有大量生物膜相结构,其中主要成分是多聚不饱和脂肪酸,易受自由基攻击,引起脂质过氧化,使膜通透性增加,膜功能丧失。同时,核酸主链断裂,透明脂酸解聚,可造成核酸变性,神经元丧失功能。在此过程中形成的大量脂质过氧化物(LPO)最终成为丙二醛(MDA),其含量的高低可间接反映机体细胞受自由基攻击的程度。本室合成的小分子抗自由基化合物的作用机制可能是通过提高 SOD 的活性,歧化 $O_2^{\cdot-}$ 生成 H_2O_2 ,再通过谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶的作用产生水。本实验通过检测大鼠血清中 MDA 的含量及 SOD 酶活力作为评价

小分子抗自由基化合物的抗自由基作用。

本实验结果显示,实验组大鼠血清中 MDA 含量降低,SOD 酶活力明显升高,光镜下脑组织海马 CA1 锥体细胞排列整齐紧密,形态基本正常,提示本室合成的小分子抗自由基化合物可提高大鼠血清中 SOD 活力,抑制脂质过氧化,保护海马锥体细胞免受缺血损害,减轻缺血、缺氧损伤对大鼠脑组织的影响。

[参考文献]

[1]冯如纯,饶明俐,张叔琴.自由基在全脑缺血再灌注损伤中的作用机理及保精增智液的保护作用[J].中风与神经疾病杂志,1995,12(3):135-136.

[2]史保中,张志强,等.东莨菪碱对兔急性脑损伤保护作用的实验研究[J].湖南医科大学学报,2001,26(6):520-524.

[3]周月琴,张敏.自由基清除剂与脑损伤[J].中国药业,2001,10(10):74-75.

[4]王凤山,张天民,姬胜利.超氧化物歧化酶的临床应用及开发[J].中国医药工业杂志,1998,29(10):472-475.

[5]Baker K, Marcus CB, Huffman K, et al. Synthetic combined superoxide dismutase/catalase mimetics are protective as a delayed treatment in a rat stroke model: a key role for reactive oxygen species in ischemic brain injury[J].Science,1998,284:215-221.

[6]王丹华,张宏,赵时敏等.硫酸镁和川芎嗪对新生鼠缺氧和缺血性脑损害的预防作用[J].中国医学科学院学报,1997,19(4):301-304.

[7]贾键民,贾键平.啮齿动物全脑缺血模型和海马选择易损性研究进展[J].国外医学脑血管疾病分册,1994,2(1):34.

[8]张敏,张辉.七叶皂甙钠对脑缺血和再灌注时大鼠脑组织中 NO 代谢的影响[J].青岛大学医学院学报,2003,39(3):294-296.

[9]Boucher LJ. Manganese shiff's base complexes- II synthesis and spectroscopy of Manganese (III)[J].J Inorg Nucl Chem, 1974,36:531-536.

(收稿日期:2003-11-19)