

• 基础研究 •

乙醇诱导大鼠脑损伤时小脑维生素 D 依赖性钙结合蛋白 28K 表达及山莨菪碱的影响

胡亚卓, 孟秀梅, 张红红, 韩志涛

[摘要] 目的 探讨乙醇诱导大鼠脑损伤时小脑维生素 D 依赖性钙结合蛋白 28K (CaBP) 表达及山莨菪碱的保护作用。方法 2 月龄 SD 雄性大鼠分别腹腔注射生理盐水、乙醇、山莨菪碱 + 生理盐水、山莨菪碱 + 乙醇 (均 $n=18$) , 8 d 后行 Morris 水迷宫测试, 免疫组化结合图像分析系统计数小脑 CaBP 阳性表达的蒲肯野细胞平均面积百分比和灰度值。结果 乙醇组 Morris 水迷宫潜伏期较其他 3 组延长 ($P<0.05$) , 游泳距离较生理盐水组和山莨菪碱 + 生理盐水组延长 ($P<0.05$) , 与山莨菪碱 + 乙醇组有延长的趋势, 但无显著性差异 ($P>0.05$) 。乙醇组小脑 CaBP 阳性表达的蒲肯野细胞计数、平均阳性细胞面积百分比和灰度值均少于其他 3 组 ($P<0.05$) , 山莨菪碱 + 乙醇组阳性细胞数与生理盐水组和山莨菪碱 + 生理盐水组无显著性差异 ($P>0.05$) , 但平均阳性细胞面积百分比和灰度值降低 ($P<0.05$) 。结论 乙醇可使小脑蒲肯野细胞的 CaBP 的表达减少; 山莨菪碱对此具有一定保护作用。

[关键词] 山莨菪碱; 乙醇; 小脑; 维生素 D 依赖性钙结合蛋白 28K (CaBP)

Expression of Calbindin D28K in Ethanol-Induced Brain Damage in Rats Cerebellum and Effect of Anisodamine on It HU Ya-zhuo, MENG Xiu-mei, ZHANG Hong-hong, et al. Laboratory of Pathophysiology, Institute of Geriatrics, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of anisodamine on calbindin D28K (CaBP) expression in the ethanol-induced brain damage in rat cerebellum. **Methods** 2 months aged male Sprague-Dawley rats were injected intraperitoneally with ethanol, normal saline, saline + anisodamine and ethanol + anisodamine respectively for 8 d. They were evaluated with Morris water maze. The counts, average area and density of CaBP positive neurons in cerebellum were measured with immunohistochemical technique and image analytical system. **Results** The latency of Morris water maze was significantly longer in the ethanol group than in the others ($P<0.05$), while the distance was significantly longer in the ethanol group than in the saline group and saline + anisodamine group ($P<0.05$). There is not significant difference between ethanol group and ethanol + anisodamine group ($P>0.05$), but it seemed some longer. The counts, average area and density of CaBP positive Purkinje cell were all significantly less in ethanol group than in the others ($P<0.05$). There was not significant difference among ethanol + anisodamine group, saline group and saline + anisodamine group ($P>0.05$) in the counts, but the average areas and density in ethanol + anisodamine group were less than those in saline group and saline + anisodamine group ($P<0.05$). **Conclusion** The ethanol can reduce the CaBP expression in the Purkinje cells of the rats cerebellum. Anisodamine can protect the rats cerebellum from it.

Key words: anisodamine; ethanol; cerebellum; calbindin D28K

[中图分类号] R749.1 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2008)05-0435-02

[本文著录格式] 胡亚卓, 孟秀梅, 张红红, 等. 乙醇诱导大鼠脑损伤时小脑维生素 D 依赖性钙结合蛋白 28K 表达及山莨菪碱的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2008, 14(5): 435-436.

近来的研究逐步显示, 存在于脑内的维生素 D 依赖性钙结合蛋白 28K (calbindin D28K, CaBP) 与老年性痴呆 (Alzheimer disease, AD)、震颤麻痹 (Parkinson disease, PD) 等神经变性疾病密切相关^[1]。而乙醇已成为神经变性疾病的重要诱因之一^[2-3]。本实验通过乙醇诱导大鼠脑损伤模型, 观察其小脑内 CaBP 的表达, 并探讨山莨菪碱对此模型的影响。

1 材料及方法

1.1 实验动物及分组 2 月龄 SD 雄性大鼠 72 只, 体重 150 ~ 200 g, 由军事医学科学院提供 (SCXK-军 2002-001), 随机分成生理盐水组 ($n=18$)、乙醇组 ($n=18$)、山莨菪碱 + 生理盐水组 ($n=18$) 和山莨菪碱 + 乙

醇组 ($n=18$)。

1.2 脑损伤模型制备 主要试剂: 无水乙醇 (分析纯), 浓度不低于 99.99% (北京北化精细化学有限公司)。盐酸消旋山莨菪碱注射液 10 mg/ml (江苏康怡制药有限公司)。

常规饲养大鼠 2 d 后, 乙醇组和山莨菪碱 + 乙醇组腹腔注射无水乙醇 13 ml/kg^[4], 1 次/d, 连续 8 d, 生理盐水组和山莨菪碱 + 生理盐水组行同等量的生理盐水腹腔注射。30 min 后, 山莨菪碱 + 生理盐水组和山莨菪碱 + 乙醇组腹腔注射山莨菪碱 30 mg/kg^[5]。

1.3 Morris 水迷宫实验 在给药第 6 天, 各组大鼠进行 Morris 水迷宫 (由北京绿缘忆科技有限公司提供) 训练, 4 次/d, 1 min/次, 2 d, 第 8、9 天进行正式测试, 记录完成 4 个象限 1 min 内找到平台的各参数。

1.4 免疫组织化学染色 大鼠脑固定于 10% 福尔马林 48 h, 取小脑脱水、石蜡包埋, 6 μ m 切片, 80 $^{\circ}$ C 烤片

作者单位: 解放军总医院老年医学研究所病理生理室, 北京市 100853。作者简介: 胡亚卓 (1979-), 女, 吉林公主岭市人, 技师, 主要从事老年病理生理研究。通讯作者: 张红红。

后,脱蜡入水,0.01 mol/L PBS (pH = 7.2 ~ 7.4) 洗,3 %过氧化氢 10 min,0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 (pH = 6.0) 微波修复 15 min,室温 30 min, PBS 洗,滴加一抗 CaBP (Sigma 公司,1 : 800) 约 50 μ l,滴加山羊血清作为阴性对照,4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗 3 次,滴加二抗 (DAKO 公司, GK500705) 室温 1 h, DAB 显色 (DAKO 公司, GK500705) 5 min,透明封片。每个标本 40 \times 物镜计算 6 个视野下 (1 \times 1 cm) 阳性细胞数, 20 \times 物镜下照相。通过 Image-Pro Plus 5.0 图像分析软件计算灰度值及阳性面积百分比。

1.5 统计学方法 采用 STATA 8.0 统计软件进行处理。所有数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示。进行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 一般情况 生理盐水组 1 只和乙醇组 2 只死亡。乙醇组大鼠在注射乙醇几天后,出现精神不振,食欲不振,消瘦,四肢无力,反应迟钝,皮毛无光泽等现象。

2.2 Morris 水迷宫实验 乙醇组潜伏期较其他 3 组延长 ($P < 0.05$), 游泳距离乙醇组与生理盐水组和山莨菪碱 + 生理盐水组有延长的趋势,但无显著性差异 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组 Morris 水迷宫行为测试结果

组别	n	时间(s)	路程(cm)	速度(cm/s)
生理盐水组	17	14.48 \pm 13.63 ^a	229.87 \pm 236.13 ^a	15.66 \pm 4.14
乙醇组	16	26.14 \pm 21.68	367.19 \pm 334.31	15.09 \pm 5.04
山莨菪碱 + 生理盐水组	18	16.22 \pm 14.89 ^a	260.22 \pm 269.68 ^a	15.81 \pm 4.68
山莨菪碱 + 乙醇组	18	18.49 \pm 16.21 ^a	298.52 \pm 272.88	16.37 \pm 4.16

注:a:与乙醇组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 免疫组化 CaBP 的阳性表达主要见于蒲肯野细胞胞浆,免疫反应后呈棕黄色,背景浅淡。乙醇组蒲肯野细胞数量较其他 3 组减少,染色浅淡;山莨菪碱 + 乙醇组可见神经细胞胞体减小,染色出现深浅不一(见封三彩图 2.1 ~ 图 2.4)。图像分析系统结果显示:乙醇组的 CaBP 阳性计数、平均面积百分比和平均灰度值均较另 3 组低 ($P < 0.05$);山莨菪碱 + 乙醇组计数与生理盐水组和山莨菪碱 + 生理盐水组无显著性差异 ($P > 0.05$),平均面积百分比和平均灰度值低于这两组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组小脑 CaBP 阳性数、阳性面积比及灰度

组别	n	阳性细胞数	阳性面积比 (%)	灰度
生理盐水组	17	8.877 \pm 1.178 ^a	8.970 \pm 1.782 ^{a,b}	181.111 \pm 17.829 ^{a,b}
乙醇组	16	4.310 \pm 1.070 ^b	1.997 \pm 0.597 ^b	93.301 \pm 9.609 ^b
山莨菪碱 + 生理盐水组	18	8.771 \pm 1.252 ^a	8.492 \pm 1.125 ^{a,b}	187.019 \pm 5.814 ^{a,b}
山莨菪碱 + 乙醇组	18	8.636 \pm 1.311 ^a	6.930 \pm 1.171 ^a	138.100 \pm 14.344 ^a

注:a:与乙醇组比较, $P < 0.05$; b:与山莨菪碱 + 乙醇组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

在影响神经元变性的因素中,细胞内线粒体能量代谢缺损是关键性的环节,而钙离子通道开放与 Ca^{2+} 内流是此环节重要因素之一。在正常生理情况下, Ca^{2+} 在细胞内外存在浓度差,当机体受到缺血、缺氧、

乙醇中毒^[1]等外界刺激后,大量的 Ca^{2+} 内流,导致细胞内 Ca^{2+} 超载,引起细胞代谢、结构、功能多方面异常改变。CaBP 是脑内调节 Ca^{2+} 的主要物质。当神经元受损、缺失后,脑细胞合成 CaBP 的能力下降、活性下调,降低了对 Ca^{2+} 的缓冲、调节作用,使得神经元对兴奋性毒性的敏感性增加,导致神经元变性死亡^[6]。

乙醇诱导脑损伤是研究 AD 等神经退行性疾病 (ND) 记忆障碍公认的动物模型^[4]。大、小鼠的乙醇依赖和耐受特点与人类基本一致。乙醇对脑的损伤首先波及小脑及海马^[7-9],表现为身体平衡、肌张力、记忆力下降等。本实验结果提示,山莨菪碱可以保护蒲肯野细胞免于乙醇的损伤,而保持更多的神经元功能。山莨菪碱作为良好的细胞保护制剂,可阻断 L 型 Ca^{2+} 通道,减缓胞浆 Ca^{2+} 的升高,对抗氧自由基的损伤,减少兴奋性氨基酸的生存和释放,减轻细胞内 Ca^{2+} 超载,从而起到保护神经元的作用^[10-11]。同时也减少了乙醇引起的 CaBP 的消耗。

本实验可作为研究乙醇中毒等引起的神经变性病病的预防和治疗参考。在此基础上,应考虑适当改变给药剂量及给药时间,以取得更理想的研究成果,为临床应用提供依据。

[参考文献]

[1] Tao L, Murphy ME, English AM. S-nitrosation of Ca(2+)-loaded and Ca(2+)-free recombinant calbindin D(28 K) from human brain [J]. Biochemistry, 2002, 41(19): 6185 - 6192.

[2] Harper C, Dixon G, Sheedy D, et al. Neuropathological alterations in alcoholic brains. Studies arising from the New South Wales Tissue Resource Centre [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2003, 27(6): 951 - 961.

[3] Harper C, Matsumoto I. Ethanol and brain damage [J]. Curr Opin Pharmacol, 2005, 5(1): 73 - 78.

[4] Tabakoff B, Hoffman PL. Animal models in alcohol research [J]. Alcohol Res Health, 2000, 24(2): 77 - 84.

[5] 张世仪, 刘洁, 何利明. 山莨菪碱对实验性脑损伤所致认知障碍的改善作用 [J]. 中国医学科学院学报, 1995, 17(4): 254 - 258.

[6] Fan Y, Shi L, Gu Y, et al. Pretreatment with PTD-calbindin D 28k alleviates rat brain injury induced by ischemia and reperfusion [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2007, 27(4): 719 - 728.

[7] Parks MH, Dawant BM, Riddle WR, et al. Longitudinal brain metabolic characterization of chronic alcoholics with proton magnetic resonance spectroscopy [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2002, 26(9): 1368 - 1380.

[8] Edwards RB, Manzana EJ, Chen WJ. Melatonin (an antioxidant) does not ameliorate alcohol-induced Purkinje cell loss in the developing cerebellum [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2002, 26(7): 1003 - 1009.

[9] Hommer DW. Male and female sensitivity to alcohol-induced brain damage [J]. Alcohol Res Health, 2003, 27(2): 181 - 185.

[10] Pang YH, Chen JW. Anisodamine causes the changes of structure and function in the transmembrane domain of the Ca(2+)-ATPase from sarcoplasmic reticulum [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2004, 68(1): 126 - 131.

[11] Esberg LB, Ren J. The oxygen radical generator pyrogallol impairs cardiomyocyte contractile function via a superoxide and p38 MAP kinase-dependent pathway: protection by anisodamine and tetramethylpyrazine [J]. Cardiovasc Toxicol, 2004, 4(4): 375 - 384.

(收稿日期: 2008-03-05 修回日期: 2008-04-22)

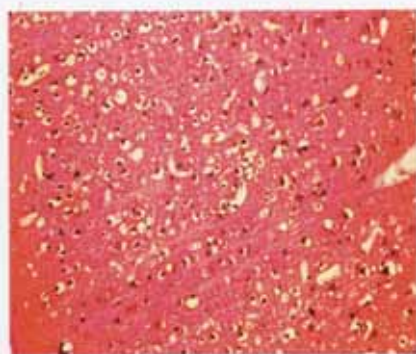


图 1.4 高剂量组大鼠脑组织
(HE 染色, 200 ×)

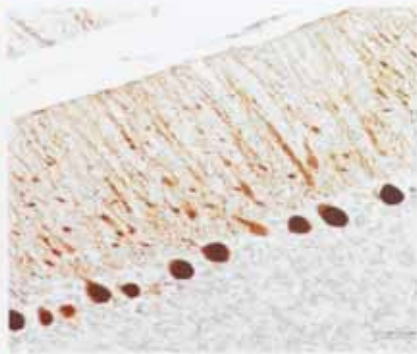


图 2.1 生理盐水组 CaBP 阳性细胞 (200 ×)



图 2.2 乙醇组 CaBP 阳性细胞 (200 ×)

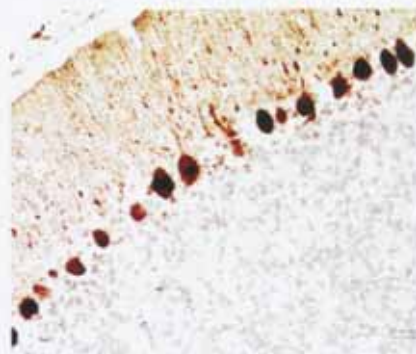


图 2.3 山萆薢碱 + 生理盐水组 CaBP 阳性
细胞 (200 ×)

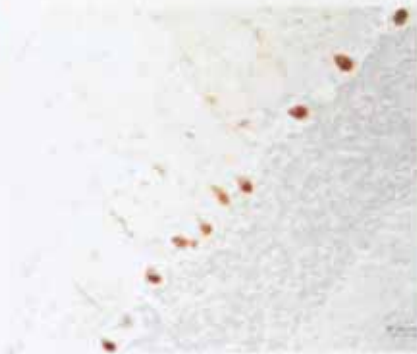


图 2.4 山萆薢碱 + 乙醇组 CaBP 阳性细胞
(200 ×)

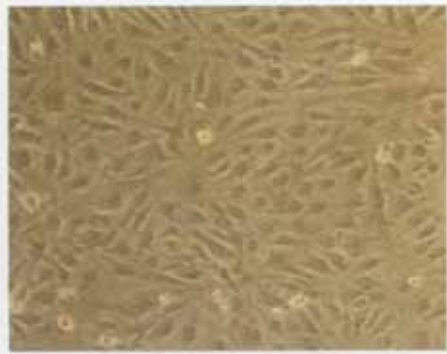


图 3.1 正常体外培养的人晶状体上皮细胞
(100 ×)