

• 论著 •

大鼠弥漫性轴索损伤后神经行为变化和
环孢霉素 A 的治疗作用

尹卫东 许百男 王晓刚

【摘要】 目的 探讨大鼠弥漫性轴索损伤(DAI)后神经行为的变化和环孢霉素 A(CsA)的治疗作用。**方法** 成年 SD 大鼠 24 只,随机分为正常对照组、损伤对照组和环孢霉素 A 治疗组($n=8$),以 Morris 水迷宫实验和避暗实验测定伤后不同时间点 DAI 大鼠学习记忆能力的变化,研究 CsA 的治疗作用。**结果** 水迷宫定位航行试验发现,随训练次数的增多,3 组大鼠潜伏期(找到平台所需时间)总体上呈逐渐下降的趋势,但 CsA 治疗组潜伏期较损伤对照组缩短($F=60.44, P<0.01$)。水迷宫空间搜索实验证实, CsA 治疗组大鼠平台搜寻成绩好于损伤对照组,与正常对照组无差别。避暗实验示正常对照组大鼠潜伏期为(292.88 ± 12.61)s, DAI 大鼠经 CsA 治疗后,进入暗室潜伏期则从(153.25 ± 69.36)s 延长至(224.75 ± 55.95)s($F=71.50, P<0.05$)。**结论** DAI 发生后,大鼠的学习记忆能力有不同程度下降, CsA 治疗可使损伤大鼠的学习记忆能力明显提高。

【关键词】 弥漫性轴索损伤; 环孢霉素 A; Morris 水迷宫

中图分类号:R965;R651.15 文献标识码:A 文章编号:1003-0603(2004)04-0214-04

Neurobehavior changes of rats after diffuse axonal injury and the treatment effect with cyclosporin A YIN Wei-dong*, XU Bai-nan, WANG Xiao-gang. * Department of Neurosurgery, General Navy Hospital of PLA, Beijing 100037, China

【Abstract】 Objective To observe rat's memory and learning behavior after diffuse axonal injury (DAI) and evaluate the treatment efficacy of cyclosporin A(CsA). **Methods** Twenty-four SD rats were divided into three groups: non-injured group($n=8$), vehicle-treated group($n=8$) to whom saline was applied and CsA-treated group($n=8$). By analyzing behavior changes of rats in Morris water maze and dark-avoidance test, the CsA treatment efficacy was evaluated. **Results** The Morris water maze was used to observe rats' memory and learning behavior. During a place-training experiment, the latency to find platform in each trial descended remarkably. Vehicle-treated group exhibited acquisition deficits compared with CsA-treatment group. The latency in each trial was longer in vehicle-treated group ($F=60.44, P<0.01$). With continued training, the rats' performance in CsA-treatment group was better than those in control brain-injured group in crossing platform test ($F=4.00, P<0.01$), but no difference with the normal group. In dark-avoidance test, the rats in normal control group had remembered the electricity shock very fast, and seldom entered into dark chamber. The mean latency time was (292.88 ± 12.61)seconds. The latency time of rats in CsA-treated group was (224.75 ± 55.95) seconds. The latency time of rats in vehicle-treated group was (153.25 ± 69.36) seconds. The time of rats in CsA-treated group was shorter than the time of vehicle-treated group animal ($F=71.50, P<0.05$). **Conclusion** The rats' memory function is impaired after DAI. The learning acquisition and memory retention impairments are ameliorated after administration of CsA.

【Key words】 diffuse axonal injury; cyclosporin A; Morris water maze

CLC number:R965;R651.15 Document code:A Article ID:1003-0603(2004)04-0214-04

脑弥漫性轴索损伤(diffuse axonal injury, DAI)占重型颅脑损伤的 28%~50%,致残率和致死率均高^[1]。在临床上 DAI 患者被抢救成功后常遗留明显的记忆力减退、逆行性健忘等症状,目前,针对 DAI 的治疗尚缺乏有效的办法^[2,3]。国外的实验

证明,在大鼠脑损伤前 30 分钟给予环孢霉素 A (Cyclosporin A, CsA) 治疗, CsA 治疗组损伤轴索较对照组减轻 70%^[4]。本实验旨在研究 DAI 后大鼠学习能力和记忆保持能力损害情况及应用 CsA 后大鼠神经功能恢复情况,以探讨 CsA 的治疗效果。

1 材料和方法

1.1 动物分组:成年 SD 大鼠 24 只,随机分为正常对照组($n=8$)、损伤对照组($n=8$)和 CsA 治疗组($n=8$),以 Morris 水迷宫实验(Morris water maze test)和避暗实验(dark-avoidance test)测定伤后不

基金项目:国家自然科学基金资助项目(398707937)

作者单位:100037 北京,海军总医院神经外科(尹卫东);
100853 北京,解放军总医院神经外科(许百男,王晓刚)

作者简介:尹卫东(1968-),男(汉族),河南省人,医学博士,主治医师。

同时间点 DAI 大鼠学习记忆能力的变化,研究 CsA 的治疗作用。

1.2 建立模型:将仵树彬等^[5]建立的装置加以改进,制作旋转致伤装置,大鼠麻醉后将其固定于致伤装置上,待麻醉清醒后旋转扳机,使大鼠头沿冠状面逆时针快速旋转 90°,造成旋转伤(旋转参数:瞬间旋转时间 < 2 ms,鼠颅角速度为 800 rad/s,角加速度 2×10^5 rad/s²)。

1.3 CsA 治疗:治疗组大鼠伤后 30 min,将大鼠俯卧位固定于手术板上,钝性分离颈后肌群,暴露环枕膜,抽出 0.3 ml 脑脊液,向枕大池注入 10 mg/kg CsA 溶液 0.3 ml(瑞士 Novartis 制药公司生产);损伤对照组大鼠手术方法同 CsA 治疗组,向枕大池内注入 0.3 ml 生理盐水代替 CsA。伤后 2 h, CsA 治疗组大鼠腹腔内注射 20 mg/kg CsA 和生理盐水混合液 2 ml;损伤对照组大鼠仅注入生理盐水 2 ml。

1.4 Morris 水迷宫行为测定:水迷宫由圆形水池和自动摄像及分析系统两部分组成。实验程序包括:①定位航行实验(place navigation),用于测量大鼠对水迷宫学习和记忆的获取能力。实验自伤后 15 d 开始,连续 5 d,上、下午各训练 1 次,共计 10 次。②空间搜索实验(spatial probe test),用于测量大鼠学会寻找平台后,对平台空间位置记忆的保持能力,自伤后 20 d 开始,正式入水点为西象限 1/2 弧度处,上午测定大鼠自入水到找到平台的游泳时间和距离,下午将平台除去,测定 120 s 内大鼠跨越平台相应位置的次数,连测 2 d,共计 2 次。数据采集和处理由图像自动监视和处理系统完成。

1.5 避暗实验:CsA 治疗组在伤后 25 d 和对照组同时进行行为训练,采用避暗实验测试大鼠近期学习记忆能力。避暗实验装置由明暗两箱组成,两室间有一直径为 8 cm 大小的圆孔,暗室内铺有铜栅,铜栅可以通电,电压为 40 V。实验时接通电源,将大鼠头朝外放入避暗箱明室,大鼠依其进入暗处的习惯,进入暗室,当四肢全进入时,因前后肢电压的不同,大鼠受电击退出暗室,训练 5 min,如大鼠 5 min 内不进入暗室,则驱入暗室,使之产生记忆。第 2 d 进

行测试,记录大鼠四肢全部进入暗室的时间为潜伏期,如 300 s 内未进入,按 300 s 计算。

1.6 统计学处理:所有统计资料用 SAS 统计软件包进行,测定结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,显著性检验用重复测量资料方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 水迷宫实验:

2.1.1 大鼠的运动轨迹:大鼠采取正常的游泳姿势,3 组大鼠的游泳速度无显著差异。在定位航行实验中, CsA 治疗组和损伤对照组大鼠学习寻找平台的行为似有差异: CsA 治疗组大鼠在训练时,先绕池壁航行,并试图沿壁爬出水面,经数次失败后,开始沿水池对角线航行,运动轨迹多为直线,这时碰到水下平台的几率随之加大,大鼠学习并意识到水下平台是逃离水面的唯一出路之后,便开始应用其空间定位能力学习和记忆平台的位置,很快学会寻找平台;损伤对照组大鼠绕池壁环行的时间较长,很少沿对角线航行,似乎以缩小包围圈的方式寻找平台,即使当大鼠通过学习意识到平台的重要性后,其寻找平台的路线也多呈曲线。

2.1.2 定位航行实验的潜伏期变化:在历时 5 d 的训练中,随训练次数的增多,3 组大鼠找到平台所需时间(潜伏期)经方差分析显示:损伤对照组潜伏期前 3 次无差别,第 4~6 次潜伏期迅速下降,从平均 104.38 s 降至 16.75 s ($P < 0.01$),然后趋于稳定,后 4 次潜伏期经方差分析无差别 ($P > 0.05$); CsA 治疗组大鼠潜伏期自训练第 2 次开始即迅速下降,自第 5 次开始就趋于稳定 ($P > 0.05$),表明大鼠通过 2 d 的训练就能学会寻找平台,然后潜伏期趋于稳定。经重复测量资料方差分析, CsA 治疗组大鼠潜伏期和损伤对照组潜伏期相比, $F = 60.44$, $P < 0.01$,说明 DAI 大鼠经 CsA 治疗后,学习能力明显提高。大鼠后 4 次(伤后 18、19 d)在迷宫中找到平台所需时间 CsA 治疗组和正常对照组相比,尽管找到平台时间有所延长 ($F = -3.97$, $P < 0.01$),但比损伤对照组显著减少 ($F = -3.44$, $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 定位航行实验中 3 组大鼠找到平台所需时间(潜伏期)比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Latency to find platform in three groups of rats during place navigation training experiment($\bar{x} \pm s$) s

组别	伤后 15 d		伤后 16 d		伤后 17 d	伤后 18 d		伤后 19 d	
	第 1 次实验	第 2 次实验	第 1 次实验	第 2 次实验	第 1 次实验	第 1 次实验	第 2 次实验	第 1 次实验	第 2 次实验
损伤对照组	118.75 ± 3.54	112.63 ± 13.70	104.38 ± 13.75	60.50 ± 18.58	48.88 ± 15.86	16.75 ± 2.92	14.13 ± 4.70	16.00 ± 5.04	15.88 ± 5.30
CsA 治疗组	114.88 ± 11.03	107.75 ± 13.78	71.50 ± 24.85	33.50 ± 10.86	18.13 ± 8.25	15.50 ± 3.70	12.25 ± 5.41	10.00 ± 3.63	11.25 ± 4.20
正常对照组	95.75 ± 28.85	42.25 ± 29.20	20.00 ± 12.60	9.88 ± 6.98	8.13 ± 4.23	9.50 ± 2.67	7.63 ± 2.77	8.00 ± 2.14	8.00 ± 2.67

2.1.3 空间搜索实验:大鼠跨越平台次数如表 2 所示。结果显示,DAI 大鼠经 CsA 治疗后,伤后 20 d 水迷宫实验平台搜寻成绩明显好于损伤对照组 ($F=-4.00, P<0.01$),与正常对照组比较无显著性差异 ($F=-1.13, P>0.05$)。伤后 21 d 与损伤对照组相比, $F=-3.50, P<0.05$;与正常对照组相比, $F=-1.00, P>0.05$ 。说明 DAI 大鼠经过 CsA 治疗后,大鼠的空间记忆能力和记忆保持能力均有所提高。

表 2 大鼠水迷宫实验平台搜寻成绩

(经过水下平台位置的次数)比较($\bar{x}\pm s$)

Tab. 2 The times to pass the platform of rats during Morris water maze experiment($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	伤后 20 d	伤后 21 d
CsA 治疗组	8	8.25±2.55	8.38±2.67
损伤对照组	8	4.25±1.91	4.88±1.73
正常对照组	8	9.38±2.39	9.38±2.33

2.2 避暗实验:各组大鼠经训练后,第 2 d 开始正式测试(伤后第 26 d)。正常对照组对电击产生了较强记忆,测试时大部分大鼠在测试时间内不再进入暗室,或头部进入后很快缩回,潜伏期为(292.88±12.61)s;CsA 治疗组进入暗室潜伏期为(224.75±55.95)s;损伤对照组进入暗室潜伏期为(153.25±69.36)s。CsA 治疗组和损伤对照组相比潜伏期延长 ($F=-71.50, P<0.05$),与正常对照组无差别 ($P=0.051$)。

3 讨论

学习、记忆实验方法的基础是条件反射。20 世纪 80 年代初,英国的心理学家 Morris 和他的同事利用大鼠在盛有水和牛奶混悬液的不透明的水池中搜索目标物的方法,来研究大鼠海马等脑区受到损害后的学习、记忆和空间定向以及认知能力时,取得令人瞩目的成果^[6]。这种装置构思新颖,实验设计合理,方法简便实用,便于观察和记录动物入水后搜索目标所需的时间、采用的策略和它们的游泳轨迹,从而可分析和推断动物的学习、记忆和空间认知等方面的能力。Morris 水迷宫被公认是检测大鼠学习和记忆(尤其是空间记忆)较好的方法。Morris 水迷宫实验中,从大鼠游泳轨迹图分析,3 组大鼠的游泳速度无显著差异,而 CsA 治疗组和损伤对照组大鼠学习寻找平台的行为似有差异。CsA 治疗组大鼠在训练时,先绕池壁航行,并试图沿壁爬出水面,经数次失败后,开始沿水池对角线航行,运动轨迹多为直线,这时碰到水下平台的几率随之加大,大鼠学习并

意识到水下平台是逃离水面的惟一出路之后,便开始应用其空间定位能力学习和记忆平台的位置,很快学会寻找平台;损伤对照组大鼠绕池壁环行的时间较长,很少沿对角线航行,似乎以缩小包围圈的方式寻找平台,即使当大鼠通过学习意识到平台的重要性后,其寻找平台的路线也多呈曲线。从大鼠游泳轨迹图分析,两组大鼠从出发到找到平台位置游泳距离差异明显,证明大鼠 Morris 水迷宫实验潜伏期的差异是由于大鼠的早期学习能力和短期记忆能力不同,寻找平台所采取的游泳路线不同造成的。

Morris 水迷宫可考察空间参考记忆,参考信息存在于每次实验的过程中,因此参考记忆需要多次的学习才能获得。在 Morris 水迷宫实验中,为逃避水难,大鼠发现并爬上平台,多次重复后逐渐形成了对平台的空间记忆。DAI 后 15 d,在历时 5 d 的训练中,随训练次数的增多,3 组大鼠潜伏期均逐渐下降证明了这一点。训练期间,损伤对照组大鼠潜伏期前 3 次无差别,第 4~6 次潜伏期迅速下降,从平均 104.38 s 降至 16.75 s,然后趋于稳定,后 4 次潜伏期经方差分析无差别;而 CsA 治疗组大鼠潜伏期自训练第 2 次开始即迅速下降,自第 5 次开始就趋于稳定,说明大鼠通过 2 d 的训练就很快学会找到平台,而损伤组大鼠却需要漫长的学习时间。经重复测量资料方差分析,CsA 治疗组大鼠潜伏期比同期损伤对照组缩短,说明 DAI 大鼠经 CsA 治疗后,学习能力提高。

Morris 水迷宫实验一般包括两个方面:①定位航行试验,用于测量大鼠对水迷宫学习和记忆的获取能力;②空间搜索实验,用于测量大鼠学会寻找平台后,对平台空间位置记忆的保持能力。因为空间搜索实验反映的是大鼠对空间的精确定位,因此其实实验成绩最有价值。本实验中发现,DAI 大鼠经 CsA 治疗后,空间搜索实验平台搜寻成绩明显好于损伤对照组,与正常对照组无差别。说明 DAI 大鼠经 CsA 治疗后对空间记忆的保持能力提高。

大鼠避暗实验发现,正常对照组大鼠对电击很快产生了较强记忆,测试时大部分大鼠在测试时间内不再进入暗室,或头部进入后很快缩回,而损伤对照组大鼠进入暗箱的潜伏期比正常对照组短,说明 DAI 可造成大鼠记忆力下降,DAI 大鼠经 CsA 治疗后,尽管避暗实验潜伏期较正常对照组短,但仍比损伤对照组长,说明 CsA 有治疗作用。

Morris 水迷宫实验时,大鼠为躲避水难主动寻找平台,而避暗实验时,大鼠受到电击时被动逃避出

暗室,两种实验从大鼠的不同行为研究其学习和记忆能力,结果均证明 CsA 对 DAI 后记忆障碍有治疗作用。

CsA 是由真菌产生的具有免疫抑制作用的物质,作为免疫抑制剂,CsA 已被广泛应用于器官移植领域和自身免疫性疾病的治疗。但近年国外动物实验证明,CsA 对 DAI 具有较好疗效^[7]。其机制为:细胞内高 Ca^{2+} 导致的线粒体损害和轴索内蛋白溶解为创伤性轴索损伤的两大原因,CsA 通过和线粒体膜上环孢霉素受体(cyclophilin)结合,稳定线粒体膜,通过减少线粒体损害和减轻轴索内血影蛋白溶解两个方面减轻弥漫性轴索损害。作为免疫抑制剂,CsA 应用于临床已多年,近年来动物实验证实,CsA 在治疗脑损伤特别是 DAI 方面有较好的前景,但 CsA 不能通过血-脑脊液屏障,且 CsA 本身为免疫抑制剂,药物剂量过大可引起动物肢体抽搐、四肢瘫痪甚至癫痫发作^[8]。因此,需要对 CsA 治疗 DAI 进行广泛深入的研究以寻求合理的药物剂量、给药途径和治疗时机。

参考文献:

- 1 Bennett M, Clinico O. Pathologic observations in 100 consecutive patients with fatal head injury admitted to a neurosurgical unit [J]. Ir Med J, 1995, 88(2): 59-62.
- 2 江基尧,朱诚,主编.现代颅脑损伤学[M].第1版.上海:第二军医大学出版社,1999. 219-222.
- 3 胡小吾,王文仲,赵孟尧,等.弥漫性轴索损伤的临床救治[J].中国危重病急救医学,1997,9(11):685-686.
- 4 Okonkwo D O, Povlishock J T. A single intrathecal bolus of cyclosporin; a before injury preserves mitochondrial integrity and attenuates axonal disruption in traumatic brain injury [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1999, 19: 443-451.
- 5 元树彬,许百男,孟宇宏,等.大鼠弥漫性轴索损伤的超微结构研究[J].中华外科杂志,2000,80(1):71-73.
- 6 张均田,主编.现代药理实验方法[M].第1版.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998. 1020.
- 7 Tephew W S, Patrick G S. Cyclosporin; a significantly ameliorates cortical damage following experimental traumatic brain injury in rodents [J]. J Neurotrauma, 1999, 16(9): 783-792.
- 8 Wijdsicks E F M, Wiesner R H, Krom R A F. Neurotoxicity in liver transplant recipients with cyclosporine immunosuppression [J]. Neurology, 1995, 45: 1962-1964.

(收稿日期:2003-11-01 修回日期:2004-02-21)

(本文编辑:李银平)

• 启事 •

《急诊急救医学常用方法图解》、《英汉现代医院质量管理词汇》、 《现代医院医疗质量管理》征订启事

由解放军第一五五医院任真年院长著述的《急诊急救医学常用方法图解》、《英汉现代医院质量管理词汇》和《现代医院医疗质量管理》3本书已由人民军医出版社出版。

《急诊急救医学常用方法图解》一书由中国人民解放军总后勤部卫生部白书忠部长和中华医学会急诊医学专业委员会主任委员江观玉教授作序。该书中的133种预案和程序,基本包括了目前最常见的急诊急救疾病和意外伤害种类,能使各级医务人员在各种环境中,依此及时地处理各类急诊急救患者,将有效地减少急、危、重症患者的病死率,提高其抢救成功率。本书图解直观,编排新颖,预案科学,程序规范,条理清晰,层次分明,内容丰富,资料翔实,实用性、指导性较强。

《英汉现代医院质量管理词汇》一书参考百余种国内外最新的管理和质量管理专著、报刊、杂志,共收集英汉现代医院质量管理参考词汇近万条,基本涵盖了与现代医院质量管理相关的全部英汉词汇,并突出了目前国内外最常用的质量管理、质量认证、计算机网络词汇等。全书求新、求实、求全,内容新颖,词汇丰富,查阅方便,是医院管理者必备的工具书,也可供医疗机构医务人员、医学院校师生参阅。

《现代医院医疗质量管理》一书由中国人民解放军总后勤部卫生部白书忠部长作序,吸收了国内外医院管理,特别是质量管理的最新理论。该书结合医院实际情况,借鉴了国外研究的“顾客满意度”、“全面质量管理”、“质量文化”等最新研究成果,为现代医院医疗质量管理探索了新思路、新方法,适用于医院管理人员和质量控制人员,临床科室和医技科室主任、护士长、医生和护生参考,亦可供医学院校师生阅读参考(备注:该书已第四次印刷)。

定价:《急诊急救医学常用方法图解》每本45元;《英汉现代医院质量管理词汇》每本30元;《现代医院医疗质量管理》每本24元。欲购者请与解放军第一五五医院信息科联系。联系地址:河南省开封市医院前街3号解放军第一五五医院信息科;邮编:475003;联系电话:(地方线)0378-3971015,(军线)0431-58875、58870;联系人:殷春燕,刘笑迎。